

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
ED414**

UMR7242 - Poly(ADP-ribosyl)ation et Intégrité du génome

THÈSE présentée par :

Christian BOEHLER

soutenue le : **20 septembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie - Aspects moléculaires et
cellulaires de la biologie

**Rôles de la poly(ADP-ribose) polymérase-3
(PARP-3) dans la réponse cellulaire aux
dommages dans l'ADN
et la progression mitotique**

THÈSE dirigée par :
DANTZER Françoise

Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
LOPEZ Bernard
CURTIN Nicola

Professeur, Institut Gustave Roussy
Professeur, Newcastle University

AUTRES MEMBRES DU JURY :

TOMASETTO Catherine-Laure

Docteur, Université de Strasbourg

Table des matières

Table des matières	2
Liste des figures et tableaux	9
Liste des abréviations et acronymes	15
INTRODUCTION	
I. La Poly(ADP-ribosyl)ation	19
A. Le NAD ⁺ , la brique de base du Poly(ADP-ribose) (PAR)	19
B. La synthèse d'ADP-ribose et le principe d'ADP-ribosylation	19
C. Interactions covalentes et non covalentes avec le PAR.....	21
1. Modification des protéines cibles par fixation covalente du PAR.....	21
2. Domaines de liaison au PAR et interaction non covalente	22
2.1. Le motif de fixation au PAR (PAR-binding motif).....	22
2.2. Le doigt de zinc de fixation au PAR (PAR-binding zinc finger ou PBZ).....	22
2.3. Le domaine Macro	23
2.4. Le domaine WWE.....	24
D. Catabolisme du Poly(ADP-ribose).....	24
II. La famille des Poly(ADP-ribose) polymérase	26
A. Classification des PARPs selon leurs structures et leurs domaines	26
1. PARPs dépendantes de l'ADN.....	27
1.1. PARP-1.....	27
1.2. PARP-2.....	29
1.3. PARP-3.....	30
1.3.1. Epissage alternatif et isoformes.....	30
1.3.1.1. Identification	30
1.3.1.2. Deux isoformes chez les primates, une seule chez la souris	31
1.3.2. Structure modulaire et localisations sub-cellulaires.....	31
1.3.2.1. Structure modulaire	31
1.3.2.2. Localisation(s) cellulaire(s).....	32
1.3.3. Activité enzymatique.....	33
1.3.4. Partenaires identifiés	33
1.3.4.1. Les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN.....	33
1.3.4.2. Les protéines impliquées dans la répression transcriptionnelle	34
1.3.5. Expression tissulaire et fonctions connues de PARP-3.....	37
2. Les Tankyrases (TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase)	38

2.1. Tankyrase-1	38
2.1.1. Structure modulaire de la Tankyrase-1	39
2.1.2. La Tankyrase-1 et la surveillance de l'intégrité télomérique.....	40
2.1.3. Tankyrases et voie Wnt.....	40
2.2. Tankyrase-2.....	41
3. Les PARPs à doigts de zinc CCCH (CCCH-PARPs)	41
3.1. PARP-7.....	42
3.2. PARP-12.....	42
3.3. PARP-13.....	42
4. Les macro-PARPs	43
4.1. PARP-9.....	43
4.2. PARP-14.....	43
4.3. PARP-15.....	44
5. Les autres PARPs	44
5.1. PARP-4.....	44
5.2. PARP-10.....	45
5.3. PARP-16.....	45
5.4. PARP-6, 8 et 11.....	45
B. Classification des PARPs selon leur activité enzymatique	45
C. Une nouvelle nomenclature	48
III. Les PARPs et la réparation de l'ADN	50
A. Implications des PARPs dans la réparation des cassures simple-brin de l'ADN.....	50
1. Génération des SSB.....	50
1.1. Les SSB endogènes	50
1.1.1. Action des ROS (Reactive Oxygen Species)	50
1.1.2. Action des Topoisomérases.....	51
1.2. Les SSB exogènes	51
1.2.1. Radiations ionisantes.....	51
1.2.2. Action des agents alkylants	51
2. Implication des PARPs dans les mécanismes de BER/SSBR.....	51
2.1. Mécanisme du BER.....	52
2.2. Implications de PARP-1 et PARP-2 dans le processus du BER/SSBR	53
2.3. Choix de la voie de réparation du BER/SSBR.....	55

B. Implications des PARPs dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN.....	55
1. Génération des DSB	55
1.1. Les DSB physiologiques	55
1.1.1. Recombinaison V(D)J	55
1.1.2. Commutation de classe des immunoglobulines	58
1.1.3. Hypermutation somatique	58
1.1.4. Recombinaison méiotique	57
1.2. Les DSB endogènes	58
1.2.1. Action des ROS (Reactive Oxygen Species)	58
1.2.2. Action des Topoisomérases.....	58
1.2.3. Réplication d'une SSB non réparée	58
1.3. Les DSB exogènes	59
1.3.1. Radiations ionisantes.....	59
1.3.2. Agents chimiques	53
2. Les mécanismes de réparation des DSB	61
2.1. La recombinaison homologue (HR : Homologous Recombination).....	61
2.2. La recombinaison non-homologue (NHEJ : Non-Homologous End-Joining).....	62
2.2.1. Le NHEJ Classique	64
2.2.2. Le NHEJ Alternatif	65
2.3. Le NHEJ Alternatif, un mécanisme qui bouleverse les conventions	68
2.4. Interconnexions entre les 3 voies de réparation	70
2.4.1. Choix du mécanisme de réparation des DSB en phase G1	70
2.4.2. Choix du mécanisme de réparation des DSB en phases S et G2.....	72
3. PARPs et réparation des cassures double-brin de l'ADN	73
3.1 PARP-1 et PARP-2 dans la réponse cellulaire aux DSB	73
3.2. PARP-1 et PARP-2, actrices du HR lors d'un blocage de la fourche de réplication	73
.....	73
IV. PARPs et division cellulaire	74
A. Les PARPs impliquées dans les processus mitotiques	74
1. PARP-1 et PARP-2	74
2. PARP-4.....	75
3. Tankyrase-1	75
4. Tankyrase-2.....	75

B. Role de la Tankyrase-1 dans la mitose à travers la régulation du facteur mitotique NuMA.....	75
V. Objectifs et cheminement du projet de recherche.....	78
CHAPITRE I : PARP-3, un nouvel acteur de la réparation de l'ADN.....	80
1. Introduction	80
Publication n°1	82
2. Résultats	83
2.1. PARP-3 est impliquée dans les mécanismes de réparation des DSB.....	83
2.2. PARP-3 agit en synergie avec PARP-1 dans la réponse cellulaire aux dommages induits par des radiations ionisantes.....	84
2.3. L'absence de PARP-3 sensibilise les cellules humaines aux agents générant des DSB85	
2.4. L'efficacité du NHEJ <i>in vitro</i> est diminuée en absence de Parp-3.....	87
2.5. PARP-3 : un acteur des NHEJ Classique ET Alternatif ?.....	88
2.6. La déplétion conjointe de PARP-3 et RAD51 induit une sensibilité accrue des cellules MRC5 aux DSB induites par l'Etoposide	90
2.7. La déplétion de PARP-3 accélère la phosphorylation de RPA et le recrutement de RAD54 en réponse à l'Etoposide	91
3. Discussion et perspectives.....	93
3.1. PARP-3, un nouvel acteur de la réparation des DSB par le NHEJ	93
3.2. L'absence de PARP-3 induit-elle une activation de la réparation par le HR ?	96
4. Conclusion.....	97
CHAPITRE II : PARP-3 et progression mitotique.....	99
1. Introduction	99
2. Résultats	99
2.1. PARP-3 forme un complexe avec NuMA et la Tankyrase-1	99
2.2. PARP-3 a un rôle régulateur clé du complexe PARP-3/Tankyrase-1/NuMA	100
2.3. PARP-3 est impliquée dans la progression mitotique	100
2.4. PARP-3 est impliquée dans la surveillance du fuseau mitotique.....	100
2.5. PARP-3 est impliquée dans la surveillance de l'intégrité télomérique.....	101

3. Discussion et perspectives.....	103
3.1. Deux isoformes d'une même enzyme pour deux mécanismes cellulaires différents..	103
3.2. NuMA, un partenaire de PARP-3 encore peu décrit.....	103
4. Conclusion.....	105

CHAPITRE III : Rôle de PARP-3 dans la stabilité génomique : vers une possible cible en thérapie du cancer ?	106
1. Introduction	106
1.1. Intérêt des inhibiteurs de PARPs en thérapie du cancer.....	106
1.1.1. Approche fondée sur le principe de létalité synthétique	106
1.1.2. Adaptabilité des cellules cancéreuses aux inhibiteurs PARP.....	108
1.2. Intérêt du ciblage de PARP-3 dans des cellules cancéreuses mammaires	109
1.3. Les différentes catégories de lignées cancéreuses du sein humain	109
i) Les cellules Luminales.....	109
ii) Les cellules Basales A	109
iii) Les cellules Basales B	111
2. Résultats	113
2.1. PARP-3 est fortement exprimée dans les lignées cancéreuses mammaires dites agressives	113
2.2. La déplétion de PARP-3 induit une forte diminution du taux de survie des cellules cancéreuses mutées en BRCA1	115
2.3. La déplétion conjointe de PARP-3 et de BRCA1 ou RAD51 induit spontanément une forte diminution du taux de survie des lignées cancéreuses mammaires Basales B	117
2.4. La déplétion de PARP-3 induit une amplification centrosomale exacerbée dans les cellules cancéreuses mutées en BRCA1.....	120
2.5. La déplétion de PARP-3 induit une augmentation du nombre de cellules polynucléées dans les lignées tumorales Basales B	125
2.6. La déplétion de PARP-3 promeut la génération de micronoyaux dans la lignée cancéreuse Basale B mutée en BRCA1.....	125
3. Discussion et perspectives.....	128
3.1. Des études préliminaires prometteuses basées sur le principe de létalité synthétique	128
3.2. PARP-3 et Tankyrase-1 : une implication commune dans l'amplification centrosomale ?.....	129
3.3. Mise en perspective.....	129

4. Conclusion.....	130
Conclusion générale	132
A. PARP-3, une enzyme aux multiples facettes enfin mieux cernée.....	132
1. Un nouvel acteur des mécanismes de réparation de l'ADN.....	132
2. Membre et régulateur d'un complexe protéique impliqué dans les phénomènes mitotiques	132
B. Caractérisation fonctionnelle de PARP-3 : et maintenant ?	133
1. Caractérisation structurale.....	133
2. PARP-3 pourrait interagir avec encore d'autres protéines.....	134
C. PARP-3, une cible potentielle en thérapie du cancer du sein	135
Publication n°2	137
Annexe : Description des différentes phases d'essais cliniques	138
Publication n°3	140
Matériel et Méthodes	141
Essai COMET en conditions alcalines	141
Test d'efficacité du NHEJ <i>in vitro</i>	141
Extraits nucléaires de rates de souris.....	141
Digestion du plasmide substrat de réparation	142
Test d'efficacité de ligation <i>in vitro</i>	142
Lignées et cultures cellulaires	143
Déplétions transitoires par ARN interférence	144
Tests de survie cellulaire par clonogénicité	144
Western Blot.....	144
Immunofluorescence	145
Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative.....	145
Extraction d'ARN	145
Traitement aux DNases et purification d'ARN.....	146
RT-PCR quantitative (RT-qPCR)	146
Bibliographie	148

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : La molécule de Nicotinamide Adénine Dinucléotide.....	19
Figure 2 : La synthèse d'ADP-ribose.....	20
Figure 3 : Alignement de séquences de protéines contenant le motif de fixation au PAR D'après (Pleschke et al., 2000).....	23
Figure 4 : Structure cristallographique de la protéine AF1521 associée à l'ADP-ribose : D'après (Karras et al., 2005).	24
Figure 5 : Hydrolyse du PAR par la PARG	25
Figure 6 : Décondensation de la chromatine induite par la poly(ADP-ribosyl)ation : D'après (Wacker et al., 2007).	28
Figure 7 : Structure modulaire de PARP-3	32
Figure 8 : Structure modulaire de la Tankyrase-1	39
Figure 9 : Représentation schématique des membres de la famille PARPs : D'après (Hakmé et al., 2008).....	49
Figure 10 : Schéma simplifié du mécanisme du BER/SSBR : D'après (Caldecott, 2007).	54
Figure 11 : Schéma des différentes recombinaisons permettant la diversité des immunoglobulines : D'après (Teng and Papavasiliou, 2007).	57
Figure 12 : Schéma de la réplication d'une SSB.....	59
Figure 13 : Structure des agents chimiques Bléomycine, Néocarzinostatine et Etoposide.....	61
Figure 14 : Schéma simplifié du mécanisme de Recombinaison Homologue.....	63
Figure 15 : Schéma simplifié du mécanisme du NHEJ Classique	66
Figure 16 : Schéma simplifié du mécanisme du NHEJ Alternatif	68
Figure 17 : Schéma de ligation au cours du NHEJ Alternatif : (Rass et al., 2012).....	69
Figure 18 : Interconnexion des voies Classique et Alternative du NHEJ : D'après (Mladenov and Iliakis, 2011).....	71
Figure 19 : Structure modulaire de NuMA	76
Figure 20 : Modèle d'interaction entre la Tankyrase-1 et NuMA au cours de la mitose.....	77
Figure 21 : Structure oligomérique de NuMA : D'après (Harborth et al., 1999).....	77
Figure 22 : Plasmide pEBV utilisé pour la construction des vecteurs pBD1080 transfectés dans la lignée MRC5 PARP-3 ^{kd} et des vecteurs pBD650 transfectés dans la lignée MRC5 contrôle ctl.....	81
Figure 23 : L'absence de PARP-3 n'a aucun impact sur la cinétique de réparation des SSB .	84

Figure 24 : L'absence de PARP-3 induit une diminution du taux de survie après exposition à des agents générateurs de DSB	86
Figure 25 : L'efficacité du NHEJ est réduite <i>in vitro</i> en absence de Parp-3.....	88
Figure 26 : Un traitement à la Wortmannin et la déplétion conjointe de PARP-3 induisent une sensibilité cellulaire exacerbée aux DSB	89
Figure 27 : La déplétion conjointe de PARP-3 et XRCC1 n'induit pas une sensibilité cellulaire exacerbée aux DSB	90
Figure 28 : La déplétion conjointe de PARP-3 et RAD51 induit une sensibilité cellulaire exacerbée aux DSB induites par l'Etoposide	91
Figure 29 : La phosphorylation de RPA induite par l'Etoposide se fait plus précocement dans les cellules PARP-3 ^{kd}	92
Figure 30 : Le nombre de cellules présentant des foyers RAD54 augmente plus rapidement en absence de PARP-3 en réponse à l'Etoposide.....	93
Figure 31 : Représentation schématique du système rapporteur d'activité du NHEJ <i>in vivo</i> : D'après (Rass et al., 2009)	96
Figure 32 : Localisation de PARP-3 aux pôles du fuseau mitotique dans les cellules HeLa.	101
Figure 33 : Les DSB spontanées dues à l'absence de PARP-3 ne sont pas localisées au niveau des télomères	102
Figure 34 : Principe de la létalité synthétique appliqué à des cellules cancéreuses déficientes en HR dans lesquelles PARP-3 est déplétée	110
Figure 35 : Les différentes catégories de cellules de cancer du sein.....	112
Figure 36 : Marqueurs utilisés pour classifier les cellules de cancer du sein : D'après (Blick et al., 2008).....	113
Figure 37 : Expressions endogènes de PARP-3 et de la Tankyrase-1 dans diverses lignées cancéreuses.....	114
Figure 38 : La déplétion de PARP-3 induit une forte létalité dans les lignées cancéreuses mutées en BRCA1	116
Figure 39 : La déplétion conjointe de PARP-3 et BRCA1 induit une forte létalité dans les lignées cancéreuses non-mutées en BRCA1	118
Figure 40 : La double déplétion de PARP-3 et RAD51 induit une forte létalité des cellules cancéreuses non-mutées en BRCA1	120
Figure 41 : Amplification centrosomale dans les cellules HS 578T après déplétion de PARP-3	122

Figure 42 : Amplification centrosomale dans les cellules MDA-MB 436 après déplétion de PARP-3.....	123
Figure 43 : Représentation schématique des différents mécanismes utilisés par les cellules cancéreuses pour contrôler l'amplification centrosomale	124
Figure 44 : La déplétion de PARP-3 induit une augmentation du nombre de cellules polynucléées	126
Figure 45 : La déplétion de PARP-3 induit une augmentation du nombre de cellules présentant des micronoyaux dans les lignées cancéreuses mutées en BRCA1	127
Figure 46 : Schéma récapitulatif de l'approche thérapeutique possible ciblant PARP-3	136

Tableaux

Tableau 1 : Liste des protéines PcG recrutées au niveau des sites de dommages à l'ADN.....	36
Tableau 2 : Liste des partenaires identifiés de PARP-3	36
Tableau 3 : Classification des PARPs en fonction de leur activité enzymatique potentielle...	47
Tableau 4 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour la RT-qPCR.....	147

Liste des abréviations et acronymes

Liste des abréviations et acronymes

53BP1 : tumor suppressor p53-Binding Protein 1

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AID : Activation-Induced (Cytidine) Deaminase

AIF : Apoptosis-Inducing Factor

ALC1 : Amplified in Liver Cancer protein 1

ANK : Ankyrin

APE1/2 : Apyrimidic/apurinic (AP)-Endonuclease 1/2

APLF : Aprataxin and Polynucleotide kinase-Like Factor

ARD : Ankyrine repeat domain

ARH3 : ADP-Ribose (arginine) Hydrolase 3

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATM : Ataxia Telangiectasia-Mutated

ATP : Adénosine TriPhosphate

ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein

BAL-1 : B Agressive Lymphoma protein 1

BER : Base Excision Repair

BLM : Bloom's syndrome protein

BMI-1 : B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog

BRCA1/2 : Breast Cancer susceptibility gene 1/2

BRCT : BRCA1 C-Terminus domain

CHFR : CHEckpoint protein with FHA and RING domains

Chk1 : Checkpoint kinase 1

CoaSt6 : Collaborator of STAT6

CSR : Class-Switch Recombination

CtIP : C-terminal Interacting Protein

DBD : DNA Binding Domain

DNA-PKcs : DesoxyriboNucleic Acid-dependent Protein Kinase catalytic subunit

DSB : Double-Strand Break

EED : Embryonic Ectoderm Development protein

ER : Estrogene Receptor

Exo1 : Exonuclease 1

EZH2 : Enhancer of Zest Homologue 2

FEN1 : Flap Endonuclease 1

GFP : Green Fluorescent Protein

HDAC : Histone Deacetylase

HER2 : Human Epithelial growth factor Receptor 2

HR : Homologous Recombination

IL-4 : Interleukine-4

iNOS : calcium-calmodulin independent Nitric Oxide Synthase

MAR : Matrix Attachment Regions

mART : mono(ADP-ribosyl)transferase

MAVS : Mitochondrial AntiViral Signaling protein

MMR : MisMatch Repair

Mre11 : Meiotic recombination 11 homolog 1

MT : MicroTubule-binding domain

MVP : Major Vault Protein

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NF-kB : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NHEJ : Non-Homologous End-Joining

NLS : Nuclear Localization Signal

NoLS : Nucleolar Localization Signal

NuMA : Nuclear Mitotic Apparatus protein

OGG1 : 8-oxoguanine DNA Glycosylase 1

p34cdc2 : protein 34 Cell Division Control 2

PAR : Poly(ADP-ribose)

PARG : Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase

PARP : Poly(ADP-Ribose) Polymérase

PcG : Polycomb group proteins

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PNK : PolyNucleotide Kinase

POT1 : Protection Of Telomeres 1

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ

PR : Progesterone Receptor

PRC : Polycomb Repressiv Complexe

PRD : PARP Regulatory Domain

RAD : Radiation sensitive

RAP1 : Repressor/Activator site-binding Protein 1

RAP80 : Receptor-Associated Protein 80

RIG-1 : Retinoic acid Inducible Gene 1 protein

RING1/2 : Really Interesting New Gene protein 1/2

ROS : Reactive Oxygen Species

RPA : Replication protein A

RRM : RNA Recognition Motif

RXR : Retinoid X receptor

SAM : Sterile Alpha Motif

siRNA : small interfering RiboNucleic Acid

SSB : Single-Strand Break

SSBR : Single-Strand Break Repair

STAT6 : Signal Transducer and Activator of Transcription 6

SUZ12 : Suppressor of Zeste 12 protein homolog

Tankyrase : TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase

TCDD : 2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxin

TDP1 : Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1

TEP-1 : Telomerase-associated Protein-1

Ti-PARP : TCDD-Inducible PARP

TIN2 : TRF1 interacting protein 2

TPP1 : TIN2 and POT1 interacting Protein 1

TRF1/2 : Telomeric-Repeat binding Factor

UDG : Uracil-DNA Glycosylase

VPARP : Vault-PARP

WFS1 : Wolfram syndrome 1

WRN : Werner syndrome protein helicase

XLF : XRCC4-Like Factor

XRCC1/4 : X-ray Repair Cross-Complementing protein 1/4

YY1 : Yin and Yang 1

I. La Poly(ADP-ribosylation)

A. Le NAD^+ , la brique de base du Poly(ADP-ribose) (PAR) :

Le Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) est un agent d'oxydo-réduction pouvant exister sous 2 formes : l'agent d'oxydation NAD^+ et l'agent de réduction : NADH. Le NAD est composé de 2 nucléotides contenant une adénine et un nicotinamide (**figure 1**).

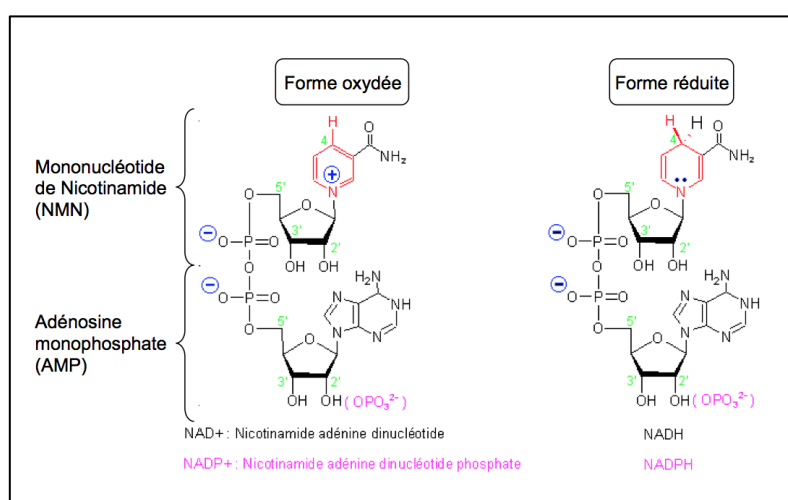


Figure 1 : La molécule de Nicotinamide Adénine Dinucléotide

B. La synthèse d'ADP-ribose et le principe d'ADP-ribosylation :

Les Poly(ADP-ribose) polymérase (PARPs) utilisent le NAD^+ comme substrat pour synthétiser des unités d'ADP-ribose sur les protéines acceptrices, dont nous verrons quelques exemples par la suite.

La réaction d'ADP-ribosylation débute avec le clivage de la liaison glycosidique entre le ribose et le nicotinamide. Ceci a pour conséquence la libération d'une molécule de Nicotinamide qui pourra ensuite être recyclée en molécule de NAD^+ . Ce mécanisme de recyclage nécessite de l'énergie sous forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate). Une activité PARP maintenue aura donc pour effet une déplétion progressive du pool d'ATP dans la cellule pouvant la conduire à une mort par nécrose.

Après ce clivage, la molécule d'ADP-ribose ainsi formée est composée de 2 molécules de ribose, de 2 molécules de phosphate et d'une molécule d'adénine. Cette molécule est ensuite fixée par les PARPs sur les groupes carboxyles des résidus lysine, glutamate ou aspartate de la protéine acceptrice (Altmeyer et al., 2009) (**figure 2**).

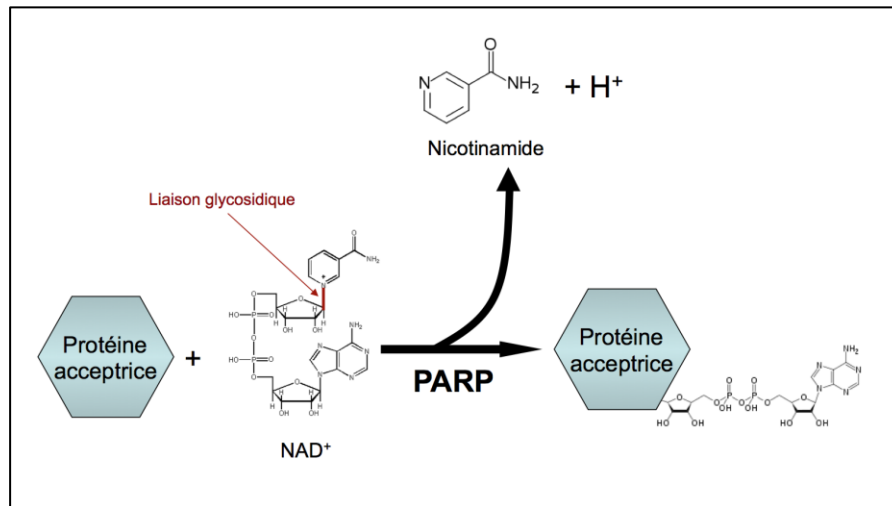


Figure 2 : La synthèse d'ADP-ribose

La Poly(ADP-ribosylation) est la synthèse d'un polymère branché d'ADP-ribose. Ce polymère peut atteindre des tailles différentes, allant de quelques unités seulement à plus de 200 (D'Amours et al., 1999).

Les poly(ADP-ribose)s (PAR) courts, de l'ordre d'une dizaine d'unités, sont appelés des oligo(ADP-ribose)s. Les PAR les plus longs présentent des branchements toutes les 40 unités d'ADP-ribose (Keith et al., 1990).

A titre d'exemples, PARP-1 est capable de former des polymères branchés dépassant les 200 unités, PARP-2 également (Amé et al., 1999), tandis que PARP-3 peut générer des polymères allant jusqu'à 15 unités d'ADP-ribose seulement (Rulten et al., 2011) et que la Tankyrase-1 synthétise une longue chaîne linéaire de plus de 100 unités d'ADP-ribose (Rippmann et al., 2002).

Comme nous le verrons par la suite, toutes les PARPs ne sont pas capables de synthétiser un polymère d'ADP-riboses. Certaines ne peuvent synthétiser qu'une seule unité d'ADP-ribose sur leur protéine cible. On parle dans ce cas de mono(ADP-ribosylation).

C. Interactions covalentes et non covalentes avec le PAR :

Le PAR est une structure possédant une forte densité de charges négatives. Ceci lui permet d'établir des liaisons ioniques stables.

Cette molécule a de nombreuses fonctions au sein de la cellule et la poly(ADP-ribosyl)ation se retrouve impliquée dans un nombre sans cesse croissant de mécanismes cellulaires. De manière très générale la poly(ADP-ribosyl)ation est une modification post-traductionnelle réversible qui peut moduler la fonction de la protéine cible.

1. Modification des protéines cibles par fixation covalente du PAR :

Les PARPs sont en règle générale capables de s'automodifier, modification pouvant servir d'autorégulation de leur propre activité. Le premier substrat de PARP-1 est avant tout elle-même. Son automodification lui permet de réguler son interaction avec des protéines et l'ADN, et a pour conséquence d'inhiber son activité catalytique (Krishnakumar and Kraus, 2010).

Mais les PARPs sont également capables de modifier d'autres substrats qu'elles-mêmes. On parle alors d'hétéromodification. Ces modifications post-traductionnelles sont covalentes et ont un fort impact sur la structure et la fonction des protéines. Les protéines cibles des PARPs sont essentiellement nucléaires et sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires, tels que la régulation de l'architecture chromatinienne, la réparation de l'ADN, la transcription et la réplication.

Le PAR permet le recrutement de protéines (voir paragraphe ci-après), mais peut également intervenir pour dissocier les protéines ainsi modifiées de l'ADN. La nature de cet effet est sujette à controverse : il peut soit s'agir d'une répulsion entre la protéine modifiée et l'ADN lui-même, le PAR et l'ADN étant tous deux chargés négativement, soit d'un encombrement stérique trop fort ne permettant plus à la protéine modifiée de rester liée à l'ADN.

L'exemple type de ce genre de dissociation est la relaxation de la chromatine provoquée par les PARPs après hétéromodification des histones. La relaxation de la chromatine est requise dans les processus de transcription, réplication et réparation de l'ADN. PARP-1 est capable d'hétéromodifier l'histone H1 tandis que PARP-2 a pour substrat

l'histone H2B (de Murcia et al., 1986 ; Amé et al., 2004). Ces hétéromodifications auront pour conséquence la modification locale de la protéine cible, sa dissociation de la chromatine et la relaxation de cette dernière.

2. Domaines de liaison au PAR et interaction non covalente :

Le PAR peut également établir des liaisons non covalentes. Il sert ainsi à recruter différents facteurs disposant de site de liaison au PAR dans leur structure. De nombreuses protéines sont recrutées grâce à leur interaction avec le PAR synthétisé par les PARPs. Il existe 4 motifs/domaines de fixation au PAR : le motif de fixation au PAR, le doigt de zinc de fixation au PAR, le domaine Macro et le domaine WWE (De Vos et al., 2012 ; Kalisch et al., 2012).

2.1. Le motif de fixation au PAR (PAR-binding motif) :

Le motif de fixation au PAR (PAR-binding motif) fut le premier motif identifié et correspond à une séquence de 20 acides aminés (Pleschke et al., 2000). Il est formé de 2 régions conservées : l'une comportant des résidus chargés positivement, l'autre étant une séquence consensus -hxbxhhbbhhb- (h : résidu hydrophobe ; b : résidu basique ; x : résidu aléatoire).

Ce motif est retrouvé dans des protéines clés de la réparation de l'ADN (ex : XRCC1, ADN Ligase III, DNA-PKcs, Ku70), de la régulation du cycle cellulaire (ex : iNOS, NF-kB), de la mort cellulaire (ex : p53, p21) et de la structure chromatinienne (ex : histones H3.1, H4, H2A, H2B) (**figure 3**).

2.2. Le doigt de zinc de fixation au PAR (PAR-binding zinc finger ou PBZ) :

Le doigt de zinc de fixation au PAR (PAR-binding zinc finger ou PBZ) fut identifié dans la protéine impliquée dans la réponse cellulaire aux dommages APLF (Aprataxin PNK-Like Factor) et l'ubiquitine ligase CHFR (CHECKPOINT protein with FHA and RING domains) (Ahel et al., 2008). Ce domaine présente 2 Cystéines et 2 Histidines séparées par 6 à 8 acides aminés. Il n'existe que chez les eucaryotes (exceptée la levure).

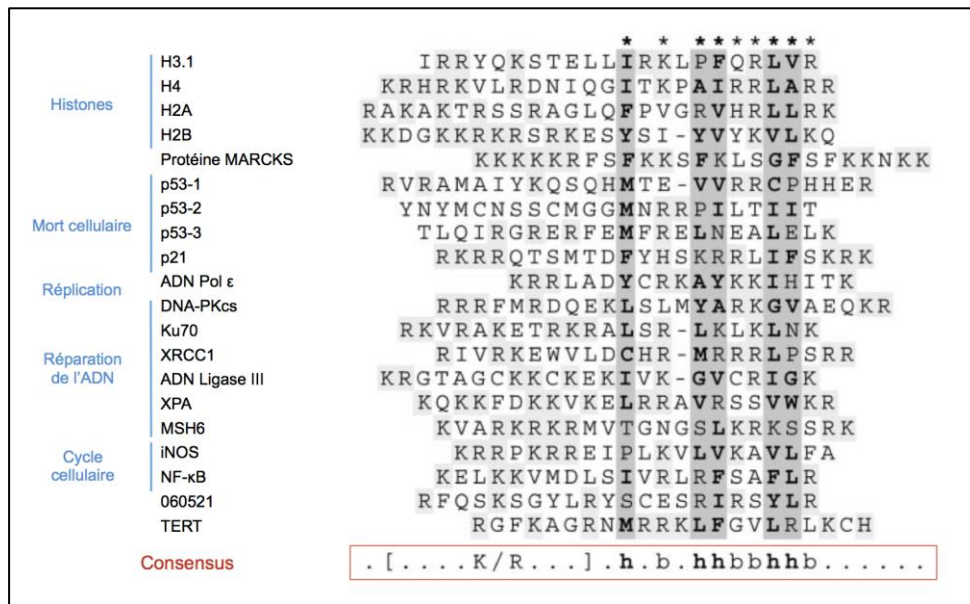


Figure 3 : Alignement de séquences de protéines contenant le motif de fixation au PAR : D'après (Pleschke et al., 2000).

Les résidus hydrophobes conservés sont surlignés en gris et les résidus acides en gris clair. * : acides aminés les plus conservés (plus de 50%) ; h : résidu hydrophobe ; b : résidu basique

MARCKS : Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate ; DNA-PKcs : DeoxyriboNucleic Acid-dependent Protein Kinase catalytic subunit ; XRCC1 : X-ray Repair Cross-Complementing protein 1 ; XPA : Xeroderma Pigmentosum group A-complementing protein ; MSH6 : MutS protein Homolog 6 ; iNOS : calcium-calmodulin independent Nitric Oxide Synthase ; NF-κB : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ; TERT : TElomerase Reverse Transcriptase.

2.3. Le domaine Macro :

Le domaine Macro est une séquence conservée de 190 acides aminés. Sa structure a été déterminée par l'étude de la protéine AF1521, une protéine thermophile de l'archaea *Archaeoglobus fulgidus*. (Karras et al., 2005). C'est un domaine globulaire possédant une poche hydrophobe en forme de « L » dans laquelle peut se placer le PAR.

On retrouve ce domaine dans des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine telles que ALC1 (Ahel et al., 2009) ou l'histone macroH2A1.1. Ce domaine est également retrouvé au sein des macro-PARPs (PARP-9, 14 et 15) (**figure 4**).

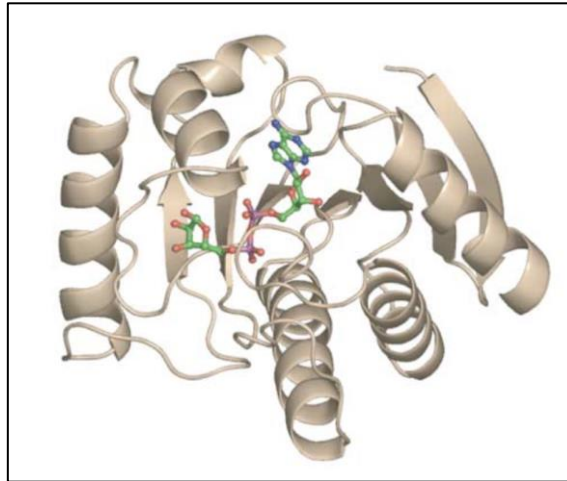


Figure 4 : Structure cristallographique de la protéine AF1521 associée à l'ADP-ribose : D'après (Karras et al., 2005).

Cette protéine représentée en rubans est un domaine Macro dont la structure est formée d'hélices α et de feuillets β formant une poche hydrophobe dans laquelle s'enchaîne l'ADP-ribose, ici représenté en structure bâtonnet.

2.4. Le domaine WWE :

Le domaine WWE est un domaine contenant deux résidus Tryptophane (W) et un résidu Glutamine (E) conservés. Il a été initialement découvert dans la protéine Deltex qui est une E3 ubiquitine ligase (Aravind, 2001). Il a été montré récemment que le domaine WWE de l'ubiquitine-ligase Iduna est capable de se lier au PAR, et plus particulièrement à sa structure interne appelée iso-ADP-ribose (Wang et al., 2012). On retrouve ce domaine dans la structure de 5 PARPs : PARP-7, 11, 12, 13 et 14.

D. Catabolisme du Poly(ADP-ribose) :

Le PAR est ainsi impliqué dans bon nombre de mécanismes moléculaires et cellulaires. Sa présence doit donc être contrôlée le plus finement possible. Sa production est très rapide, sa dégradation également : la durée de vie du PAR est de l'ordre de 15 minutes, ce qui en fait une macromolécule extrêmement dynamique. Cette dégradation sera assurée par la Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase (PARG) (Ueda et al., 1972 ; Hatakeyama et al., 1986). Cette enzyme ubiquitaire peut hydrolyser les liaisons glycosidiques entre les différentes unités

d'ADP-ribose via ses activités endo- et exo-glycohydrolases, ce qui a pour conséquence de libérer une quantité importante d'ADP-riboses libres (Amé et al., 2009).

La PARG fut initialement décrite comme incapable de catalyser la libération du dernier ADP-ribose présent sur la protéine acceptrice. Cette réaction est assurée par l'ADP-ribosyl Lyase qui catalyse de façon non hydrolytique le largage d'un ADP-3''-deoxy-pentos-2''ulose (**figure 5**) (Davidovic et al., 2001). Cependant, il a tout de même été proposé que la PARG soit également capable d'hydrolyser l'ADP-ribose proximal du PAR (Desnoyers et al., 1995).

Récemment, une activité ADP-ribose hydrolase a été décrite dans une étude sur l'ADP-Ribose (arginine) Hydrolase 3 (ARH3). Cette enzyme a une activité qui nécessite du Mg^{2+} et qui est moins importante que celle retrouvée chez la PARG (Oka et al., 2006).

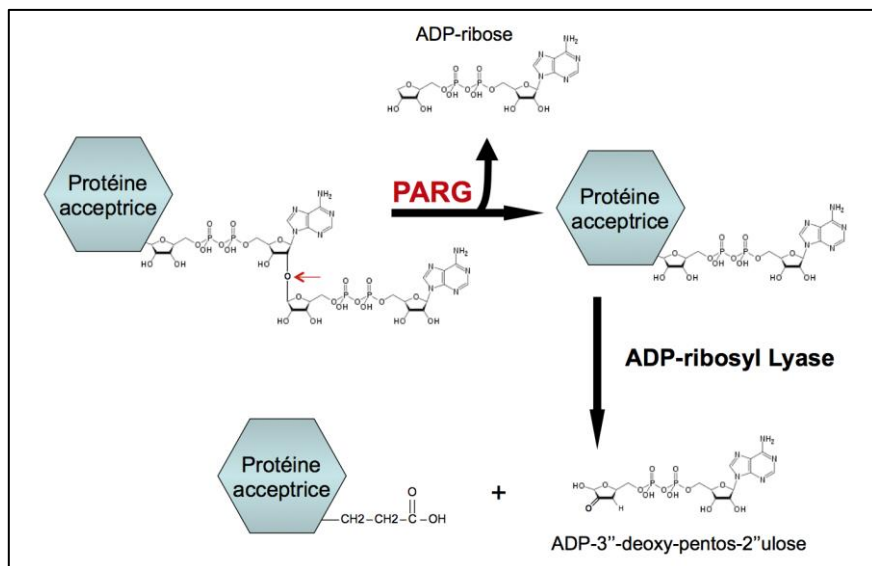


Figure 5 : Hydrolyse du PAR par la PARG :

L'hydrolyse est réalisée au niveau des liaisons glycosidiques, linéaires ou branchées.

II. La famille des Poly(ADP-ribose) polymérase

Les PARPs forment une famille de 17 membres, présentant des similitudes quant à leur domaine catalytique, mais également de grandes différences structurales. Enfin, ces protéines sont loin d'être toutes caractérisées.

Elles sont impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires tels que la réparation de l'ADN, la régulation transcriptionnelle, le métabolisme énergétique, les phénomènes mitotiques et la mort cellulaire. Les PARPs dont la caractérisation est avancée présentent la particularité d'être souvent impliquées dans plusieurs de ces mécanismes. C'est le cas de PARP-1 et PARP-2 par exemple.

A. Classification des PARPs selon leurs structures et leurs domaines :

La famille des PARPs a été établie par rapport au domaine catalytique de son membre fondateur, PARP-1 (Amé et al., 2004). En effet, la recherche de protéines homologues de PARP-1 a été réalisée dans la base de données non redondante NCBI après la détermination de la structure tridimensionnelle du domaine catalytique de PARP-1 de poulet (Schreiber et al., 2006).

Ce domaine est parfois appelé domaine PARP voire « signature PARP ». Toutefois ce domaine catalytique n'est pas identique d'une PARP à l'autre, certains résidus pouvant varier. Le domaine PARP est le plus souvent localisé en position C-terminal, sauf dans le cas de la PARP-4. Les autres domaines présents chez les PARPs sont très variés : il peut s'agir de séquence de signalisation cellulaire (NoLS, NLS...), de domaines d'interaction protéine-protéine (BRCT, SAM, ANK...) ou de domaines de liaison à l'ADN/ARN (DBD, RRM...).

La famille PARP inclut plusieurs sous-groupes faisant le plus souvent référence à la structure des protéines en faisant partie. Ces sous-groupes sont présentés ci-dessous. Toutefois, il ne s'agit que de portraits rapidement brossés et non exhaustifs. Les PARPs qui

seront les plus étudiées dans ce manuscrit, PARP-3 et Tankyrase-1 bénéficieront d'une description plus détaillée.

1. PARPs dépendantes de l'ADN :

Il existe 3 PARPs dont l'activité enzymatique est activée par des cassures dans l'ADN : PARP-1, PARP-2 et PARP-3.

1.1. PARP-1 :

PARP-1 est le membre fondateur de la famille PARP. C'est une protéine de 113 kDa codée par le gène *parp1* situé au locus 1q41-42 sur le chromosome 1 chez l'être humain. Il est estimé qu'elle est responsable de la génération de 70 à 90% du PAR total dans la cellule, même si le pourcentage exact n'est pas connu.

Cette enzyme est certainement la PARP la mieux étudiée et celle qui est impliquée dans le plus grand nombre de mécanismes cellulaires à l'heure actuelle, allant de la surveillance de l'intégrité du génome à la régulation transcriptionnelle et la mort cellulaire.

Elle fut initialement décrite comme actrice des processus de réparation de l'ADN. En effet, des souris déficientes en PARP-1, ou des fibroblastes qui en sont issus, présentent une sensibilité accrue aux radiations ionisantes ou aux agents alkylants (Masutani et al., 2000).

PARP-1 intervient aussi bien dans la réparation des cassures simple-brin (BER/SSBR : Base Excision Repair/Single Strand Break Repair) (Dantzer et al., 2000) que des cassures double-brin (NHEJ Alternatif, et HR lors du blocage d'une fourche de réplication). Ce dernier point sera abordé plus en détail dans le paragraphe III, B, 3.

PARP-1 agit comme un détecteur de cassures grâce aux deux doigts de zinc présents dans son domaine de liaison à l'ADN (Ali et al., 2012). PARP-1 sera ensuite capable de s'homodimériser et s'automodifiera afin de recruter les différents intervenants du mécanisme de réparation.

PARP-1 est également un facteur de régulation de la transcription. Une analyse d'expression génique par microarray dans des cellules souches embryonnaires ou de foie murines *parp1*^{-/-} a pu mettre en évidence le fait que PARP-1 est impliquée dans la régulation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes. En effet, il s'avère que près de 3,3% des gènes

sont régulés par PARP-1, et que ces gènes sont alors très majoritairement surexprimés (Ogino et al., 2007).

PARP-1 régit la transcription de plusieurs façons : par modulation de la structure chromatinienne elle-même ; par sa fixation directe à des enhancers ou à des structures d'ADN spécifiques ; par son intervention au sein de complexes protéiques régulateurs des promoteurs/enhancers ; ou par sa participation à la régulation des insulateurs, éléments d'ADN permettant d'organiser le génome en sous-unités contrôlant l'effet des enhancers et l'établissement de l'hétérochromatine (Kraus, 2008).

En quantité saturante et en absence de NAD^+ , elle est capable de se lier aux nucléosomes et d'instaurer *in vitro* un degré de compaction supplémentaire de la chromatine, tel l'histone H1. En revanche, en présence de NAD^+ , l'automodification de PARP-1 conduit à sa libération par répulsion des charges négatives du PAR et de l'ADN d'où relaxation de la chromatine (Wacker et al., 2007) (**figure 6**).

PARP-1 est également, par exemple, un co-activateur de NF- κ B, et, en tant que tel, régule la voie de signalisation de NF- κ B aboutissant à la synthèse de facteurs inflammatoires (Olivier et al., 1999 ; Hassa et al., 2003).

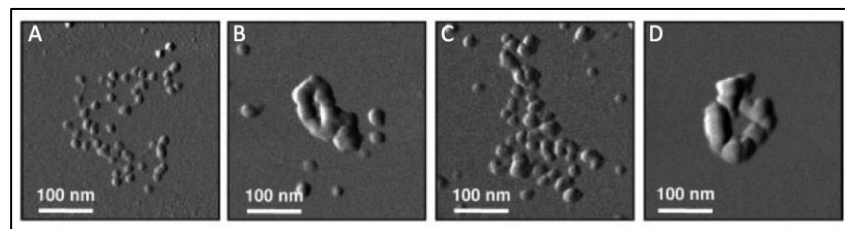


Figure 6 : Décondensation de la chromatine induite par la poly(ADP-ribosylation) : D'après (Wacker et al., 2007).

Image en microscopie à force atomique de la chromatine sans histone H1 (A), puis après ajout de PARP-1 induisant une compaction de la structure chromatinienne (B). La présence simultanée de NAD^+ et de PARP-1 stimule l'activité de cette dernière, provoquant une décondensation de la chromatine (C). L'histone H1 seul provoque une condensation de la chromatine (D) comparable à celle observée lorsque PARP-1 est inactive (B).

PARP-1 est également impliquée dans les processus de réplication de l'ADN. Elle est en effet membre d'un complexe multi-protéique de réplication (Coll et al., 1997) qu'elle est capable de réguler via son activité de poly(ADP-ribosylation) (Simbulan-Rosenthal et al., 1998).

PARP-1 joue aussi un rôle dans les mécanismes apoptotiques et nécrotiques.

En effet, il a été montré qu'elle joue un rôle dans un mécanisme d'apoptose indépendant des caspases médié par l'endonucléase AIF (Apoptosis-Inducing Factor). En réponse à la production de poly(ADP-ribose), cette endonucléase mitochondriale pro-apoptotique migre dans le noyau pour déclencher la compaction et la fragmentation de l'ADN. En absence de PARP-1, ou après traitement avec un inhibiteur PARP, cette translocation n'a plus lieu, empêchant l'apoptose (Yu et al., 2002). Le rôle précis de PARP-1 dans la translocation nucléaire de AIF n'a en revanche pas été établi.

Si PARP-1 agit comme un facteur de survie cellulaire en présence de dommages quantitativement modérés de l'ADN, une quantité importante de dommages va conduire à une hyperactivation de PARP-1. La génération massive de PAR qui en résulte aura pour effet une déplétion progressive du NAD^+ et donc de l'ATP de la cellule aboutissant à une mort cellulaire nécrotique indépendante des caspases baptisée « parthanathos » (Heeres and Hergentrother, 2007 ; David et al., 2009).

1.2. PARP-2 :

PARP-2 est codée par le gène *parp2* situé au locus 14q11.2 sur le chromosome 14 chez l'être humain. Son produit d'expression peut donner naissance à 2 isoformes par épissage alternatif. PARP-2 est l'enzyme présentant le plus d'homologie séquentielle et structurale avec PARP-1. Il est estimé qu'elle est responsable de la génération de 5 à 15% du PAR total dans la cellule. (Amé et al., 1999 ; Szántó et al., 2012). PARP-2 a un rôle désormais établi dans le mécanisme du BER, interagissant avec plusieurs protéines y étant impliquées : PARP-1, XRCC1, ADN polymérase β et ADN Ligase III (Nicolás et al., 2010). Néanmoins, tout comme PARP-1, des études récentes indiqueraient un possible rôle de PARP-2 dans les mécanismes de réparation des DSB (Yélamos et al., 2008). Ce dernier point sera abordé plus en détail dans le paragraphe III, B, 3.

PARP-2 présente beaucoup de similitudes fonctionnelles avec PARP-1, notamment dans la réparation de l'ADN, mais également des fonctions plus uniques, surtout dans des mécanismes de différenciations cellulaires. D'une part, la disruption du gène *parp-2* chez la souris entraîne un dysfonctionnement de l'hétérodimère $\text{PPAR}\gamma/\text{RXR}$ dans les adipocytes, ce qui a pour conséquence de perturber l'adipogénèse chez ces souris (Bai et al., 2007).

D'autre part, PARP-2 est également impliquée dans les mécanismes de spermatogénèse. En effet, les souris mâles déficientes en PARP-2 sont atteintes d'hypofertilité suite à des anomalies de la méiose I et de la spermiogénèse (Dantzer et al., 2006).

PARP-2 intervient également dans les processus de maturation lymphocytaire. Il a été montré que le nombre de thymocytes est divisé par 2 dans les souris *Parp-2^{-/-}* suite à la sur-expression du facteur proapoptotique Noxa. Ces thymocytes présentent également une expression réduite du récepteur membranaire T, signe d'une recombinaison V(D)J déficiente (Yélamos et al., 2006).

De plus, PARP-2 apparaît comme étant également impliquée dans le processus de commutation de classe des immunoglobulines (Class Switch Recombination : CSR) et a été proposée comme évitant les translocations aberrantes d'oncogènes tel que c-myc au cours de ce processus (Robert et al., 2009).

Note : les processus de recombinaison V(D)J et CSR seront abordés dans le paragraphe III, B, 1.

Enfin, PARP-2 est impliquée dans la maintenance de l'intégrité des télomères, tout comme la Tankyrase-1. Elle y régule TRF2, qui est une protéine membre du complexe de protection des télomères, en l'hétéromodifiant (Dantzer et al., 2004).

1.3. PARP-3 :

1.3.1. Epissage alternatif et isoformes :

1.3.1.1. Identification :

PARP-3 a d'abord été identifiée grâce à un criblage de banque EST en se basant sur la séquence du domaine catalytique de la PARP-1 humaine (Johansson, 1999). La similarité de séquence au niveau du domaine catalytique entre PARP-1 et PARP-3 est de l'ordre de 61% et est identique à 39% (Augustin et al., 2003). Cette identification, réalisée en 1999, est restée dans l'ombre un certain nombre d'années avant que l'on s'intéresse à nouveau à la protéine.

1.3.1.2. Deux isoformes chez les primates, une seule chez la souris :

Le gène de PARP-3 est situé sur le chromosome 3 chez l'être humain, au niveau du locus 3p21, et sur le chromosome 9 chez la souris. Ce gène est formé de 11 exons chez l'humain et de 10 chez la souris. Rien que cette différence permet de mettre en lumière une particularité de PARP-3 : elle peut être synthétisée sous 2 isoformes différentes, mais ceci **uniquement chez les primates**. En effet, dans les cellules humaines et simiesques, le produit de transcription peut subir un épissage alternatif au niveau du premier exon : il en résulte 2 isoformes, une longue (540 aminoacides) et une courte (533 aminoacides). Cette dernière est la seule isoforme produite chez la souris (Augustin et al., 2003).

1.3.2. Structure modulaire et localisations sub-cellulaires :

1.3.2.1. Structure modulaire :

Les domaines constituant la PARP-3 sont assez mal connus et leurs fonctions mal cernées (**figure 7**). Dans un souci de clarté, je passerai en revue les différents domaines de l'extrémité N-terminal à l'extrémité C-terminal de la protéine :

- extension N-terminal : uniquement présente dans la forme longue de PARP-3, son rôle serait vraisemblablement de permettre la localisation au niveau du centrosome. Il est à noter qu'une protéine de fusion « 54 premiers aminoacides de PARP-3-GFP » ira se localiser au niveau du centrosome (Augustin et al., 2003).

- motif NLS : la PARP-3 ne contient pas de domaine de localisation nucléaire NLS à proprement parlé, mais un motif putatif de discrimination nucléaire situé en position 21 et de séquence PEKKKGR (résultat non publié).

- domaine WGR : domaine dont la fonction demeure inconnue à ce jour. Il est nommé ainsi en raison d'un motif conservé d'acides aminés W/G/R (Tryptophane/Glycine/Arginine) et est similaire aux domaines WGR de PARP-1 et PARP-2. Une étude a montré que ce domaine est absolument nécessaire à l'activité catalytique de PARP-1 et 2, mais cette même étude n'a pas réussi à déterminer son rôle dans PARP-3 (Altmeyer et al., 2009). Le domaine WGR est inclus dans le domaine E, nommé ainsi en référence au domaine E de PARP-1.

- domaine PRD (PARP Regulatory Domain) ou domaine F : domaine qui pourrait être impliqué dans la régulation de l'activité du domaine catalytique.

Ce domaine contient un domaine PIP qui est décrit comme un motif d'interaction avec PCNA. Toutefois aucune interaction entre PCNA et PARP-3 n'a jamais été mise en évidence. Le domaine PIP débute en position 197 et s'achève en position 204 ; sa séquence est QKLITNIF (résultat non publié).

- domaine catalytique : véritable « signature PARP », ce domaine est indispensable pour que la PARP-3 ait une activité enzymatique. Ce domaine catalytique est très similaire à celui de PARP-1 et leur plus grande différence est au niveau des boucles entourant le site actif (Lehtiö et al., 2009).

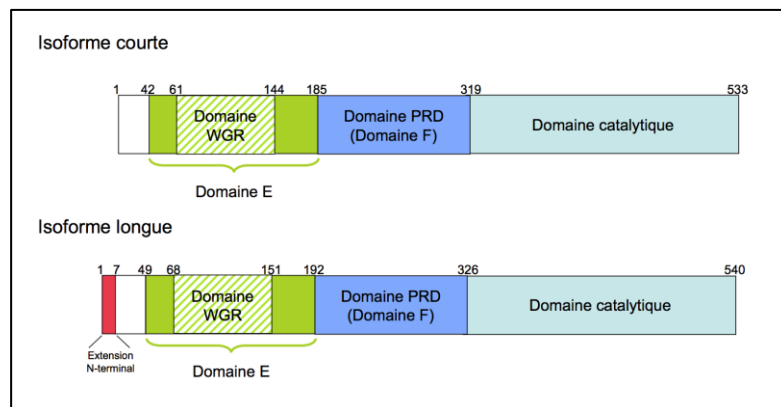


Figure 7 : Structure modulaire de PARP-3 :

Les 2 isoformes de PARP-3 ne diffèrent que par la présence/absence de l'extension N-terminal.

1.3.2.2. Localisation(s) cellulaire(s) :

Les 2 isoformes de PARP-3 n'ont pas la même localisation cellulaire :

- la forme courte est nucléaire, présente chez les primates et la souris
- la forme longue est localisée au niveau du centriole fille et n'est présente que chez les primates (Augustin et al., 2003).

Ce dernier point est absolument essentiel pour mieux appréhender les résultats à venir présentés dans cette thèse.

1.3.3. Activité enzymatique :

L'étude de l'activité enzymatique de PARP-3 a fait l'objet de plusieurs publications. Il a d'abord été montré, par Loseva et al. (Loseva et al., 2010) que PARP-3 catalyse une réaction de **mono**(ADP-ribosyl)ation. Cet article ajoute que PARP-3 est capable de stimuler l'activité de PARP-1 *in vitro* et d'hétéromodifier l'histone H1, alors nouveau substrat de PARP-3.

Un second article (Rulten et al., 2011) démontre quant à lui que PARP-3 est capable de **poly**(ADP-ribosyl)er l'histone H1.2 et que le polymère synthétisé peut atteindre une taille de 15 sous-unités d'ADP-ribose.

Il est envisageable de concilier ces deux études en imaginant que PARP-3 est capable de mono- ou de poly(ADP-ribosyl)er ses cibles selon leurs natures et/ou l'environnement dans lequel prend place la réaction enzymatique. Si cette hypothèse est fondée, il est également possible d'imaginer que PARP-3 peut réguler finement ses substrats via leur mono- ou poly(ADP-ribosyl)ation.

1.3.4. Partenaires identifiés :

Des analyses par immunoprécipitation utilisant un anticorps dirigé contre PARP-3 suivie d'une spectrométrie de masse ont permis d'identifier un certain nombre d'interactants protéiques intervenant soit dans les mécanismes de réparation de l'ADN, soit dans la répression transcriptionnelle (Rouleau et al., 2007).

1.3.4.1. Les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN :

Identifiées par spectrométrie de masse, elles interagissent aussi bien avec la forme courte qu'avec la forme longue de PARP-3. Ces partenaires peuvent être classés en deux groupes :

- les protéines impliquées dans la réparation des cassures simple-brin de l'ADN par les mécanismes de BER/SSBR (Base Excision Repair/Single-Strand Break Repair) : **PARP-1**, **XRCC1**, **ADN Ligase III**. Ces protéines sont également impliquées dans le NHEJ (Non-Homologous End-Joining) Alternatif, et c'est sans doute surtout pour cette raison qu'elles sont partenaires de PARP-3. Nous aborderons ce point ultérieurement dans ce manuscrit.

- les protéines impliquées dans la réparation des cassures double-brin via la voie Classique du NHEJ : **DNA-PKcs, Ku70, Ku80**.

Au vu des rôles admis de ces partenaires de PARP-3 dans la surveillance de l'intégrité du génome, dès le début sont apparues des hypothèses proposant PARP-3 comme acteur de la réponse cellulaire aux dommages. Nos résultats appuient ces hypothèses, comme nous le verrons par la suite dans le chapitre I.

Note : les mécanismes de réparation des NHEJ Classique et Alternatif seront décrits dans les paragraphes III, B, 2.

1.3.4.2. Les protéines impliquées dans la répression transcriptionnelle :

Identifiées par colocalisation en immunofluorescence avec PARP-3 et par suite d'une immunoprécipitation avec sa forme courte, **EZH2** et **SUZ12** font partie de ce que l'on appelle les corps Polycomb ou PcG (Polycomb group proteins).

Les protéines Polycomb sont une famille de protéines capables de former des complexes impliqués dans la régulation de l'expression de gènes, et ayant un rôle clé dans l'établissement de l'identité cellulaire. Ces protéines sont capables de maintenir de manière stable et héréditaire la répression de certains gènes, dont des gènes homéotiques (Beisel and Paro, 2011).

Les protéines PcG forment deux groupes appelés PRCs (Polycomb Repressive Complexes), de classe I (PRC1) et de classe II (PRC2). PRC2 est composé de EZH2, EED, SUZ12 et de la protéine liant les histones RbAp46/48 ; ce complexe agit comme une Histone-méthyltransférase. PRC1 est un complexe beaucoup plus grand, comprenant entre autres protéines PcG BMI-1, RING1 et RING2, et fonctionne comme une E3-Ubiquitine-ligase.

YY1, autre partenaire de PARP-3, est quant à lui un facteur de transcription qui module l'activité des PRCs. Il ferait également partie du complexe PRC1 (Sparmann and van Lohuizen, 2006).

Il est aussi à noter que plusieurs études ont montré une possible implication de certains membres des corps PcG dans les processus de réparation de l'ADN (**tableau 1**).

Par exemple, BMI-1 et RING2 sont rapidement recrutées aux sites de DSB et participent à l'ubiquitylation des histones H2A et H2AX après dommages, modification post-traductionnelle permettant la signalisation de la cassure ainsi que le recrutement de facteurs de réparation tels que 53BP1 et BRCA1. BMI-1 est décrite comme un proto-oncogène nécessaire à une réparation efficace des DSB. Son absence conduit à une augmentation de la sensibilité aux radiations ionisantes, une diminution de l'efficacité de réparation des DSB et un retard de recrutement de 53BP1 et BRCA1 aux sites de dommages. En outre, BMI-1 et RING2 sont toutes deux nécessaires à l'accumulation de la forme monoubiquitylée de γ H2AX au niveau des sites de DSB, forme nécessaire à la mise en place des acteurs de la réparation (Ismail et al., 2010).

De plus, le recrutement de BMI-1 aux sites de cassure nécessite une activité de synthèse du PAR : ce recrutement est favorisé après inhibition de PARG et diminué après traitement avec un inhibiteur de PARPs (Gieni et al., 2011).

De même, il a été montré que EZH2 est surexprimé dans les carcinomes du sein invasifs. Cette surexpression joue un rôle important dans ce type de cancer en induisant la croissance et l'invasion des cellules épithéliales du sein (Kleer et al., 2003). De plus, la surexpression de EZH2 dans des cellules épithéliales de cancer du sein a pour conséquence d'induire une diminution de l'expression de RAD51 et d'empêcher une réparation correcte des DSB. Les auteurs émettent donc l'hypothèse que ce membre des PcG participe à la tumorigénèse en altérant le mécanisme du HR (Homologous Recombination) (Zeidler et al., 2005).

De manière plus générale, une étude a montré que le recrutement des protéines PcG aux sites de dommages est régulé par la synthèse de PAR. Une inhibition de l'activité PARP ou une déplétion conjointe de PARP-1 et 2 altèrent ce recrutement. Les auteurs proposent que les PARPs instaurent une structure répressive transitoire de la chromatine aux sites de cassures pour induire une répression transcriptionnelle avec l'aide des PcG, ceci afin de faciliter la réparation de l'ADN (Chou et al., 2010).

Protéine	Complexe PcG	Recrutement aux sites de dommages générés par ...
BMI-1	PRC1	UV, radiations ionisantes et microirradiation laser
RING2	PRC1	UV, radiations ionisantes et microirradiation laser
RING1	PRC1	UV
PCGF3	PRC1	UV
Mel-18	PRC1-mel	UV
CBX4	PRC1	UV
CBX6	PRC1	UV
CBX7	PRC1	UV
CBX8	PRC1	UV
PHC1	PRC1	UV
PHC2	PRC1	UV
EZH1	PRC2	UV
EZH2	PRC2	UV, radiations ionisantes et microirradiation laser
EED	PRC2	UV
SUZ12	PRC2	UV
PHF1	PRC2	Microirradiation laser

Tableau 1 : Liste des protéines PcG recrutées au niveau des sites de dommages à l'ADN : D'après (Gieni et al., 2011).

Mel-18 est une protéine homologue de BMI-1 qui remplace ce dernier dans une version de PRC1 alors appelée PRC1-mel qui conserve l'activité d'ubiquitylation des histones de PRC1.

Mel-18 est recrutée rapidement au site de dommage suite à une exposition aux UV, puis disparaît au profit de BMI-1 (Chou et al., 2010). Les protéines indiquées en blanc font partie du complexe PRC1, les protéines indiquées en orange font partie du complexe PRC2.

Protéine	Fonction(s) cellulaire(s)	Référence bibliographique
DNA-PKcs	Réparation des DSB (NHEJ Classique)	Rouleau et al., 2007
Ku70		
Ku80		
PARP-1	Réparation des SSB (BER/SSBR) Réparation des DSB (NHEJ Alternatif)	Rouleau et al., 2007 Rouleau et al., 2011
ADN Ligase III		
XRCC1		
EZH2	Répression transcriptionnelle Réparation de l'ADN	Rouleau et al., 2007 Rouleau et al., 2011
SUZ12		
YY1		
NuMA*	Progression mitotique	Boehler et al., 2011

Tableau 2 : Liste des partenaires identifiés de PARP-3 :

NHEJ : Non-Homologous End-Joining ; BER/SSBR : Base Excision Repair/Single Strand Break Repair ; SSB : Single Strand Break ; DSB : Double Strand Break

* L'interaction de PARP-3 avec NuMA sera abordée dans le Chapitre II de ce manuscrit.

1.3.5. Expression tissulaire et fonctions connues de PARP-3 :

Des études réalisées par différents groupes ont permis de dégager des informations supplémentaires sur PARP-3 et ses possibles fonctions cellulaires. Il apparaît que PARP-3 est impliquée dans les processus de développement, ainsi que dans une coopération avec PARP-1 et 2 pour les processus de sécrétion de facteurs inflammatoires par les astrocytes. L'expression de PARP-3 dans différents tissus de singe a également été étudiée.

i) En partant du fait que PARP-3 puisse interagir avec des membres des PcG et donc possiblement avoir une fonction dans la régulation transcriptionnelle, des études ont été réalisées pour déterminer si tout comme les PcG PARP-3 était susceptible d'intervenir dans les mécanismes de développement et d'embryogénèse.

Les auteurs ont utilisé comme modèle le poisson-zèbre qui, comme la souris, ne dispose que de l'isoforme courte de la PARP-3. La déplétion de cette enzyme dans des embryons de ce modèle animal a pour conséquence des anomalies de développement sévères. En effet, la réduction de l'expression de PARP-3 aura pour conséquence des anomalies de différenciation des cellules de l'ectoderme et de la crête neurale, ce qui indique que cette enzyme est essentielle au bon développement des vertébrés.

En outre, par immunoprécipitation de chromatine en utilisant un anticorps anti-PARP-3, les mêmes auteurs ont révélé une liaison de PARP-3 à différents gènes impliqués dans la différenciation cellulaire, les développements neuronaux et crâniofaciaux. De façon intéressante, certains de ces gènes sont également cibles de SUZ12. Ceci laisse à penser que PARP-3 est impliquée dans la régulation de gènes impliqués dans le développement (Rouleau et al., 2011).

Il est à noter que les souris *Parp-3^{-/-}* que nous avons générées ne présentent aucun phénotype macroscopique global de façon spontanée. Il serait toutefois intéressant de vérifier si l'absence de *Parp-3* altère ou non certaines étapes du développement de ce modèle murin.

ii) Les astrocytes sont des cellules du système nerveux central ayant pour fonction de réguler son homéostasie, mais ils ont également la capacité de sécréter des facteurs inflammatoires après reconnaissance de pathogènes bactériens. Une étude a mis en évidence que les PARPs 1, 2 et 3 collaborent pour réguler cette libération de facteurs inflammatoires par les astrocytes. Des astrocytes déficients en PARP-1 présentent des défauts de production de facteurs

inflammatoires après stimulation bactérienne. Toutefois cette production n'est pas nulle, suggérant une compensation possible de la perte de PARP-1 par l'activité d'autre(s) PARP(s). Les auteurs ont pu déterminer que, dans le mécanisme de compensation, PARP-2 prédomine sur PARP-3 (Phulwani and Kielian, 2008).

iii) Il s'avère que PARP-3 est exprimée dans une majorité de tissus chez le singe. Cependant, au sein de ces tissus, son expression est restreinte à des types cellulaires spécifiques. De fait PARP-3 n'est pas une protéine ubiquitaire. Ceci suggère que l'expression de cette enzyme est finement régulée.

L'équipe de Rouleau et al (Rouleau et al., 2009) a effectué l'analyse détaillée d'un très grand nombre de tissus simiesques. A titre d'exemple, et de façon globale, PARP-3 est exprimée dans le cœur, les muscles lisses, le système nerveux, les glandes mammaires, les glandes salivaires mais pas dans les muscles squelettiques.

Il convient de préciser que PARP-3 est une enzyme qui n'était au final que très pauvrement caractérisée jusqu'à maintenant, comparativement à PARP-1 par exemple. Des études ont permis d'établir une liste conséquente de ses partenaires protéiques, de tester son activité enzymatique *in vitro* et de déterminer ses localisations cellulaires. En revanche, en terme de rôle purement fonctionnel, rien de vraiment précis n'était connu jusqu'alors. De ce point de vue, nous avançons en terrain presque totalement inexploré.

2. Les Tankyrases (TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase) :

Les Tankyrases sont au nombre de deux, Tankyrase-1 et 2, également appelées respectivement PARP-5a et PARP-5b. Ces 2 enzymes diffèrent par l'absence chez la Tankyrase 2 du domaine N-terminal HPS, riche en résidus histidines, prolines et sérines.

2.1. Tankyrase-1 :

La Tankyrase-1 est considérée comme l'enzyme principale responsable de la synthèse d'ADP-ribose au niveau du fuseau mitotique (Chang P et al., 2005).

Nous aborderons ce point précis dans le paragraphe IV.

Elle est impliquée dans différents mécanismes comme la surveillance de l'intégrité télomérique, l'organisation des pôles du fuseau mitotique et de l'appareil de Golgi (Smith et al., 2000 ; Chang P et al., 2005 ; Chi and Lodish, 2000).

2.1.1. Structure modulaire de la Tankyrase-1 :

La Tankyrase-1, également appelée PARP-5a, est une enzyme qui a été découverte lors d'une recherche de partenaires protéiques des protéines télomériques TRF1 et TRF2 (Smith et al., 1998).

Le gène de la Tankyrase-1 est situé sur le chromosome 8 chez l'être humain, au niveau du locus 8p23. Ce gène ne code que pour une seule isoforme, dont la localisation est nucléaire en interphase, et qui est située au niveau des pôles du fuseau mitotique au cours de la mitose.

La Tankyrase-1 possède au niveau de son extrémité N-terminal un domaine HPS (riche en Histidines, Prolines et Sérines) contenant un motif consensus MAP kinase (PXSP). La phosphorylation de ce motif suite à une stimulation par l'insuline augmente l'activité de poly(ADP-ribosyl)ation de la Tankyrase-1, ce qui fait d'elle vraisemblablement un élément des voies de signalisation impliquant l'insuline (Chi and Lodish, 2000).

La Tankyrase contient un domaine SAM (Sterile Alpha Motif) permettant des interactions protéiques avec des protéines disposant de ce même domaine SAM. La Tankyrase-1 est ainsi capable de s'homodimériser ou de s'hétérodimériser avec la Tankyrase-2.

La Tankyrase-1 possède en outre un domaine de grande taille contenant 24 répétitions Ankyrine impliquées dans les phénomènes d'interactions protéine-protéine (**figure 8**).

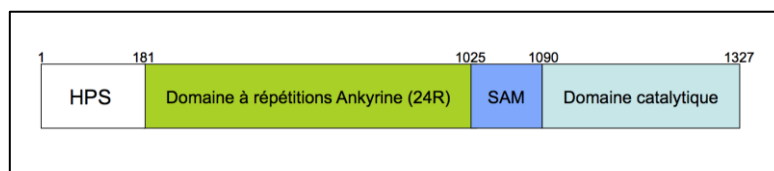


Figure 8 : Structure modulaire de la Tankyrase-1 :

HPS : His-Pro-Ser region

ARD : Ankyrine Repeat Domain : sert aux interactions protéine-protéine

SAM : Sterile Alpha Motif : peut induire une homo- ou une hétérodimérisation entre Tankyrase 1 et 2

2.1.2. La Tankyrase-1 et la surveillance de l'intégrité télomérique :

Les télomères sont formés de répétitions TTAGGG auxquelles est associé un complexe formé de 6 protéines :

- TRF1 et 2 (Telomeric-Repeat binding Factor)
- TIN2 (TRF1 INteracting protein 2)
- POT1 (Protection Of Telomeres 1)
- TPP1 (TIN2 and POT1 interacting Protein 1)
- RAP1, qui est un répresseur/activateur de la transcription

Ce complexe a pour rôle d'éviter la reconnaissance des extrémités chromosomiques comme des cassures double-brin par les protéines impliquées dans les mécanismes de réparation (de Lange, 2005).

La Tankyrase-1 a pour fonction de poly(ADP-ribosyl)er la protéine TRF1 localisée au niveau des télomères (Smith et al., 1998). Cette protéine est un régulateur négatif de l'élongation des télomères en contrôlant l'accès de la télomérase.

L'hétéromodification de TRF1 a pour conséquence son départ des télomères, ce qui permet le recrutement de la télomérase et donc l'élongation des répétitions télomériques par cette enzyme. Le contrôle de l'intégrité des télomères est nécessaire pour éviter la génération d'aberrations télomériques pouvant être sources de pertes de matériel génomique.

En effet, l'absence de Tankyrase-1 induit une augmentation des recombinaisons télomériques (Dregalla et al., 2010) ainsi que de la fréquence des fusions télomériques des chromatides sœurs par le NHEJ (Hsiao and Smith, 2009).

2.1.3. Tankyrases et voie Wnt :

Une étude a montré que les 2 Tankyrases sont impliquées dans la régulation de la voie Wnt, voie ayant un rôle essentiel dans la différenciation cellulaire, la polarité cellulaire et l'embryogénèse. Sa dérégulation peut aboutir à la formation de cancers (Logan and Nusse, 2004).

Selon cette étude, les Tankyrases semblent capables de favoriser la dégradation de la protéine Axine en déclenchant son ubiquitination. Le mécanisme d'action précis n'a cependant pas été décrit. Toutefois, l'Axine sert à réguler l'activité du complexe dégradant la β -caténine, le « complexe de destruction ». Lors de l'activation de la voie Wnt, l'Axine ne permet plus le maintien du complexe de destruction qui est alors dissocié, d'où l'accumulation nucléaire de

β -caténine et l'expression de gènes dépendants de la voie Wnt. L'inhibition des Tankyrases (avec l'inhibiteur XAV939) aura pour effet de stabiliser l'Axine (et par conséquent le complexe de destruction) et donc de bloquer la voie Wnt (Huang et al., 2009).

Une fois encore, cet exemple illustre bien les implications diverses que peuvent avoir les PARPs dans la cellule.

2.2. Tankyrase-2 :

La Tankyrase-2 est très similaire à la Tankyrase 1, tant en terme de structure que de fonctions, mais elle est pourtant bien moins caractérisée.

Elle fut initialement découverte par un test double-hybride effectué dans le cadre de recherche de partenaires de la protéine Grb14 qui peut se fixer au récepteur de l'insuline et qui intervient dans le mécanisme de transport intracellulaire des vésicules (Lyons et al., 2001).

Il a été montré que le développement de souris déficientes en l'une ou l'autre des Tankyrases n'était pas altéré. En revanche, la disruption conjointe de ces 2 enzymes induit une létalité embryonnaire, soulignant vraisemblablement une redondance de fonctions cellulaires entre la Tankyrase-1 et la Tankyrase-2 au cours du développement (Chiang et al., 2008).

Tout comme la Tankyrase-1 avec qui elle peut s'hétérodimériser, la Tankyrase-2 est capable de s'automodifier et de poly(ADP-ribosyl)er le facteur télomérique TRF1 permettant sa libération des télomères (Cook et al., 2002).

Les 2 Tankyrases sont ainsi impliquées dans l'homéostasie des télomères en régulant leur accessibilité et donc leur élongation par des télomérases. Comme vu précédemment, la Tankyrase-2 joue également un rôle dans la régulation de la voie Wnt.

3. Les PARPs à doigts de zinc CCCH (CCCH-PARPs) :

Les 3 membres de ce sous-groupe disposent dans leur structure d'au moins un doigt de zinc de type CysX₈-CysX₅-CysX₃.

3.1. PARP-7 :

PARP-7 est également appelée Ti-PARP (TCDD-Inducible PARP) car son expression est stimulée par la dioxine cancérigène TCDD (2,3,7,8-TétraChloroDibenzo-p-Dioxin). Elle est exprimée dans une large gamme de tissus chez la souris (cœur, cerveau, poumon, foie...), mais sa surexpression pourrait altérer les mécanismes neurologiques de la mémoire et du comportement (Ma et al., 2001). PARP-7 aurait également une fonction antivirale en intervenant dans les mécanismes de réduction de la réplication des virus (Atasheva et al., 2012).

3.2. PARP-12 :

PARP-12 a 2 isoformes générées par épissage alternatif, une longue disposant du domaine catalytique PARP et une courte qui en est dépourvue. L'isoforme longue a une action antivirale : elle est capable de réduire le taux de réplication de nombreux virus, même si son mode d'action reste inconnu (Atasheva et al., 2012).

Il a également été montré que PARP-12 voit son expression augmenter dans l'endomètre d'animaux en gestation (Bauersachs et al., 2006).

3.3. PARP-13 :

PARP-13 est assez semblable à PARP-12. Elle est exprimée sous 2 isoformes suite à un épissage alternatif chez les primates, la plus courte étant dépourvue du domaine PARP. PARP-13 est également exprimée chez le rat sous 2 isoformes, toutes deux dépourvues de domaine PARP ; elle est alors nommée ZAP (Zinc-finger Antiviral Protein).

PARP-13 participe tout comme PARP-12 aux réactions antivirales : elle reconnaît les ARN viraux et recrute l'exosome ARN et l'ARN hélicase p72 nécessaires à la dégradation de l'ARN (Zhu and Gao, 2008). Cette dégradation inhibe indirectement la réplication virale.

Il a été observé que la forme longue disposant du domaine PARP est plus efficace dans l'inhibition virale que la forme courte, mais la raison reste inconnue (Kerns et al., 2008). Récemment il a été montré que l'isoforme courte stimule la production d'interférons via son interaction avec l'ARN hélicase RIG-1. Après reconnaissance de l'ARN viral, RIG-1 interagira avec la protéine adaptatrice MAVS (Mitochondrial AntiViral Signaling protein) qui induira la production d'interféron et de cytokines inflammatoires (Hayakawa et al., 2011).

PARP-13 lierait donc RIG-1 pour activer la réponse immunitaire innée, tandis que son association à l'hélicase p72 servirait à la dégradation de l'ARN viral.

4. Les macro-PARPs :

Les macro-PARPs sont au nombre de trois : PARP-9 (ou BAL-1 pour B Agressive Lymphoma protein 1), PARP-14 (ou CoaSt6/BAL-2) et PARP-15 (ou BAL-3). Comme le nom de leur sous-groupe l'indique, leur structure contient des domaines macro, domaine initialement décrit dans le variant d'histone macroH2A. Comme présenté précédemment, le domaine Macro peut servir de domaine de liaison au PAR.

Ces 3 protéines sont issues de l'expression de 3 gènes qui chez l'être humain sont situés sur le chromosome 3 au locus 3q21 en tandem, ce qui laisse à penser qu'il existerait une expression coordonnée de ces protéines et peut-être des fonctions associées (Aguiar et al., 2005).

4.1. PARP-9 :

PARP-9 est dépourvue d'activité catalytique et est surexprimée dans les lymphomes diffus à larges cellules B. Son expression est inductible par l'interféron gamma et peut en retour augmenter l'expression de gènes stimulés par l'interféron : un rôle putatif de PARP-9 dans la défense immunitaire est ainsi envisagé, ainsi que dans la dissémination des cellules B malignes (Aguiar et al., 2000 ; Juszczynski et al., 2006). Cette protéine est également exprimée dans le cerveau, le tractus intestinal et les organes lymphoïdes (Hakmé et al., 2008).

4.2. PARP-14 :

PARP-14 est également appelée CoaSt6 (Collaborator of STAT6) car elle est la partenaire de la protéine STAT6, activatrice de la transcription de gènes. Ces 2 protéines sont associées dans les cellules lymphoïdes de façon physiologique, ce qui va amplifier l'expression de gènes dépendants de l'Interleukine-4 (IL-4) et de STAT6 (Mehrotra et al., 2011).

Il a été montré que PARP-14 agit initialement comme un répresseur transcriptionnel en recrutant les HDACs 2 et 3 (Histone DeAcetylase). En revanche, en présence d'IL-4, PARP-14 les ADP-ribosyle, permettant leur libération, puis PARP-14 facilitera la fixation de STAT6 sur le promoteur de ses gènes cibles. De fait, PARP-14 agit tel un interrupteur pour le mécanisme de transcription dépendant de STAT6 (Mehrotra et al., 2011).

PARP-14 promeut également l'inhibition de la caspase-3 via IL-4, ce qui permet de protéger les cellules B d'une mort par apoptose après traitement génotoxique (Cho et al., 2009).

4.3. PARP-15 :

PARP-15 n'est pas encore caractérisée à l'heure actuelle et sa fonction demeure inconnue.

5. Les autres PARPs :

Ce paragraphe répertorie les PARPs n'étant pas classées dans un sous-groupe précis.

5.1. PARP-4 :

PARP-4 (ou VPARP pour Vault-PARP) est un composant du complexe ribonucléoprotéique Vault. Ce dernier est cytoplasmique, situé au niveau des pores nucléaires, a une structure en forme de tonneau et aurait apparemment un rôle dans le transport noyau-cytoplasme et la résistance cellulaire aux drogues. Il est formé d'un ARN non traduit nommé vRNA et de 3 protéines distinctes : MVP (Major Vault Protein), TEP-1 (Telomerase-associated protein-1) et PARP-4 qui agit en tant que sous-unité catalytique et qui est capable d'ADP-ribosyler MVP (Kickhoefer et al., 1999). Cette hétéromodification aurait pour rôle de moduler la conformation du complexe Vault et d'ouvrir/fermer sa structure, vraisemblablement pour réguler l'entrée/sortie de molécules de transport.

Des études récentes proposent une implication de Vault dans les mécanismes de réparation des DSB, aussi bien dans le NHEJ que dans le HR (Lara et al., 2011).

5.2. PARP-10 :

PARP-10 est une enzyme à la fois nucléaire et cytoplasmique. Sa surexpression induit une diminution de la survie cellulaire, tandis que la diminution de son expression par ARN interférence induit un ralentissement de la phase G1 puis la mort cellulaire. Sachant qu'elle peut être phosphorylée par CDK2, que cette modification augmente son activité et que cette phosphorylation n'a pas lieu dans une population cellulaire dont la croissance est arrêtée, il a été proposé que PARP-10 intervenait dans la prolifération cellulaire sous le contrôle de CDK2 (Chou et al., 2006).

En outre, tout comme PARP-7, PARP-10 aurait une fonction antivirale en limitant la réplication des virus (Yu et al., 2011). Des études ont montré que PARP-10 est capable de s'automodifier et qu'elle est une mono(ADP-ribosyl) transférase (ou mART) (Kleine et al., 2008).

5.3. PARP-16 :

PARP-16, possédant un domaine de localisation transmembranaire, a été décrite comme une mono(ADP-ribosyl)transférase présente dans le réticulum endoplasmique et capable d'hétéromodifier le facteur de transport nucléaire Kap β 1 (Di Paola et al., 2012).

5.4. PARP-6, 8 et 11 :

Les PARPs 6, 8 et 11 n'ont quant à elles aucune fonction connue à ce jour.

B. Classification des PARPs selon leur activité enzymatique :

Les PARPs forment une famille de protéines à la fois similaires sur le plan structurel et différentes dans leur activité enzymatique. En effet, elles ont été pour la plupart à l'origine identifiées à partir d'un criblage de banques utilisant la séquence du domaine catalytique du membre fondateur PARP-1. Toute protéine possédant dans sa structure une séquence très

proche avec ce domaine était définie comme PARP, sans se soucier de sa possible fonction, de sa localisation cellulaire, de son activité enzymatique...

Il en résulte une famille assez bigarrée dont les membres ne sont hélas pas encore tous caractérisés, ce qui a abouti à un regroupement de protéines ayant des activités enzymatiques différentes, voire qui sont non catalytiquement actives.

Il a été proposé un classement des PARPs selon trois grandes catégories au regard de leur activité catalytique respective (Kleine et al., 2008) :

- les PARPs à proprement parlé : ce sont des enzymes capables de **poly**(ADP-ribosyl)er des protéines cibles, donc de générer un polymère branché d'ADP-ribose sur la protéine cible.

- les mARTs (pour mono(ADPribosyl) transférases) : théoriquement incapables de PARsylation, elles sont en revanche capables de synthétiser une unité unique d'ADP-ribose sur la protéine cible, et donc de la **mono**(ADP-ribosyl)er.

- les PARPs inactives : véritables surprises dans cette famille, ce sont des protéines disposant d'un domaine catalytique similaire à celui des autres PARP mais dont aucune activité enzymatique n'a jamais été détectée. Il convient ici de rester très prudent : sont-ce de simples protéines et non des enzymes, ou bien de véritables enzymes mais pour lesquelles les conditions expérimentales n'ont jamais été trouvées pour déceler une quelconque activité enzymatique ? La question reste ouverte.

Comme énoncé précédemment, la famille des PARPs a été établie sur la base de la présence du domaine catalytique PARP, la « signature » PARP. Ce domaine n'est toutefois pas identique d'un membre à l'autre et peut différer notamment sur une séquence de 3 acides aminés absolument essentiels à l'activité enzymatique. On parle de triade catalytique (**tableau 3**).

La triade catalytique de PARP-1 correspond aux résidus H-Y-E (Histidine-Tyrosine-Glutamate). Le glutamate est requis pour la réaction d'élongation des chaînes d'ADP-riboses et confère à PARP-1 une activité de poly(ADP-ribosyl)ation. Il en est de même pour les PARP-2, 3, 4, 5a et 5b.

En effet, le rôle de la triade catalytique de PARP-1 a été décrit (Ruf et al., 1996 ; Ruf et al., 1998). Le glutamate effectue l'attaque nucléophile sur le NAD⁺, action initiatrice de la réaction de poly(ADP-ribosyl)ation, tandis que l'histidine et la tyrosine établissent des

liaisons hydrogène et des ponts hydrophobes avec le NAD⁺ afin de le stabiliser et de l'orienter correctement au sein du site actif de l'enzyme.

Le glutamate est remplacé par une isoleucine (I), une leucine (L) ou une tyrosine (Y) chez les PARP-6-8, 10-12 et 14-16. Ceci conduit à la prédiction de l'absence d'une activité de poly(ADP-ribosyl)ation chez ces enzymes.

Enfin, les PARP-9 et 13 présentent respectivement une triade catalytique Q-Y-T (glutamine-tyrosine-thréonine) et Y-Y-V (tyrosine-tyrosine-valine). Elles sont décrites comme enzymatiquement inactives. Cette inactivité pourrait être due à l'absence du glutamate et de l'histidine qui permet l'interaction avec le NAD⁺.

Nom de la protéine	Triade catalytique	Activité prédite	Auto(ADP-ribosyl)ation démontrée	Poly(ADP-ribosyl)ation démontrée	Mono(ADP-ribosyl)ation démontrée
PARP-1	H-Y-E	Poly	+	+	ND
PARP-2	H-Y-E	Poly	+	+	ND
PARP-3	H-Y-E	Poly	+	+	+
PARP-4	H-Y-E	Poly	+	+	ND
PARP-5a	H-Y-E	Poly	+	+	ND
PARP-5b	H-Y-E	Poly	+	+	ND
PARP-6	H-Y-I	Mono	ND	ND	ND
PARP-7	H-Y-I	Mono	+	ND	ND
PARP-8	H-Y-I	Mono	ND	ND	ND
PARP-9	Q-Y-T	Inactive	ND	ND	ND
PARP-10	H-Y-I	Mono	+	ND	+
PARP-11	H-Y-I	Mono	ND	ND	ND
PARP-12	H-Y-I	Mono	ND	ND	ND
PARP-13	Y-Y-V	Inactive	ND	ND	ND
PARP-14	H-Y-L	Mono	+	ND	ND
PARP-15	H-Y-L	Mono	+	ND	ND
PARP-16	H-Y-Y	Mono	ND	ND	ND

Tableau 3 : Classification des PARPs en fonction de leur activité enzymatique potentielle :

Les protéines indiquées en orange sont les PARPs, celles indiquées en vert sont les mARTs, celles indiquées en bleu sont inactives. + : activité démontrée ; ND : activité Non Démontrée

Nous sommes donc ici face à une famille de protéines complexe (**figure 9**), qu'il n'est pas aisé d'appréhender dans sa globalité. C'est pourquoi une nouvelle nomenclature des PARPs a été proposée récemment (Hottiger et al., 2010).

C. Une nouvelle nomenclature :

« PARP » est-il alors un terme abusif ? Il serait tentant de dire non en terme de structure, au regard du domaine catalytique PARP conservé entre les 17 protéines. En revanche, la réponse est indubitablement oui si on essaie de classer ces protéines par rapport à leur activité enzymatique réelle. C'est ainsi que raisonnent les auteurs de cette nouvelle nomenclature et c'est sur ce dernier point qu'elle peut trouver sa vraie légitimité.

En revanche, sa principale faiblesse réside justement dans le fait que, tout comme la précédente nomenclature, elle regroupe enzymes et protéines, faisant fi du même coup du poly/monomère d'ADP-ribose généré et de l'inactivité de certains membres.

Cette nouvelle nomenclature rebaptise les PARPs en ADP-ribosyltransférases (ARTs) en y ajoutant un « D » pour indiquer l'homologie structurale du domaine PARP avec la toxine diphtérique. Les PARPs sont ainsi renommées ARTD.

Dans un souci de clarté, les « PARPs » resteront des « PARPs » dans ce manuscrit pour éviter d'une part toute possible confusion et surtout d'autre part pour rester en accord avec le nom des gènes codant pour ces enzymes qui sont nommés *parp1*, *parp2*, *parp3*, etc...

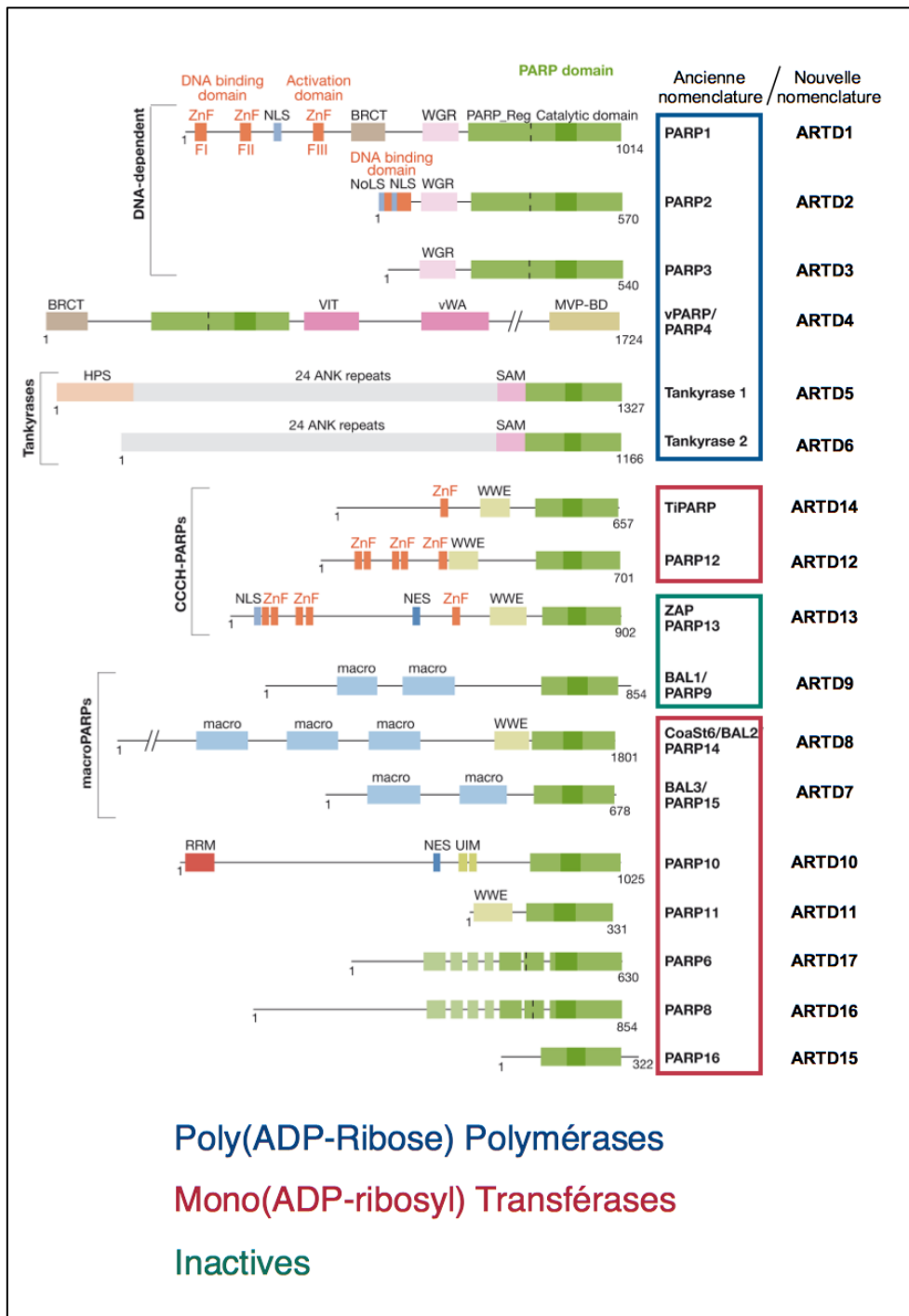


Figure 9 : Représentation schématique des membres de la famille PARPs : D'après (Hakmé et al., 2008).

Les 17 membres de la famille PARP sont ici représentés. Sont indiqués ci-dessus les sous-groupes, les types d'activités catalytiques ainsi que la nouvelle nomenclature.

III. Les PARPs et la réparation de l'ADN

A. Implications des PARPs dans la réparation des cassures simple-brin de l'ADN :

De multiples études ont été menées sur PARP-1. La poly(ADP-ribosyl)ation réalisée par cette enzyme est apparue comme une des premières réactions prenant place dans les mécanismes de réparation de l'ADN (D'Amours et al., 1999). Le PAR est désormais de fait considéré comme un élément clé de ces mécanismes. PARP-1 peut agir comme un détecteur de cassures dans l'ADN et le PAR qu'elle génère servira aussi bien à un réarrangement chromatinien qu'à recruter des facteurs de réparation. PARP-2 joue également un rôle essentiel dans les phénomènes de réparation de l'ADN.

L'ADN peut être sujet à des cassures simple-brin (SSB : Single Strand Break) ou double-brin (DSB : Double Strand Break).

1. Génération des SSB :

1.1. Les SSB endogènes :

Les SSB endogènes sont produites suite à l'action d'enzymes ou de composés métaboliques.

1.1.1. Action des ROS (Reactive Oxygen Species) :

Les ROS sont des dérivés radicalaires de l'oxygène naturels et issus du métabolisme cellulaire. Toutefois leur production peut s'accroître lors de l'exposition à un stress environnemental. Ces molécules sont hautement réactives du fait de leur valence électronique incomplète. Elles sont capables d'oxyder aussi bien les protéines que l'ADN et les lipides. L'action des ROS induit des lésions oxydatives dans l'ADN (ex : 8-oxoguanine) à raison de 20.000 par jour et par cellule (Cooke et al., 2003).

1.1.2. Action des Topoisomérases :

Les Topoisomérases de type I génèrent des SSB transitoires afin de relaxer la double-hélice d'ADN en supprimant ses super-tours, permettant la réplication de l'ADN, la transcription des gènes et la recombinaison des chromatides (Hubert et al., 2011).

1.2. Les SSB exogènes :

Les SSB exogènes sont des dommages apparaissant suite à l'exposition de la cellule à des agents clastogènes générateurs de SSB.

1.2.1. Radiations ionisantes :

Les radiations ionisantes (telles les rayons X et γ) transmettent leur énergie aux structures cellulaires sous la forme d'ionisations ponctuelles distribuées au hasard dans l'espace. Ces radiations peuvent générer des SSB.

1.2.2. Action des agents alkylants :

Les agents alkylants sont capables de fixer un groupement « alkyl » (C_nH_{2n+1}) sur les guanines de l'ADN. Il en existe une grande variété, comprenant des agents méthylants monofonctionnels (ex : Témazolomide (TMZ), N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)), des agents alkylants bifonctionnels (ex : cyclophosphamide) et des agents chloroéthylants (ex : nimustine). Les agents alkylants monofonctionnels n'ont qu'un seul groupement chimique réactif, tandis que les agents alkylants bifonctionnels en ont deux. Ces derniers sont donc potentiellement plus cytotoxiques et peuvent ponter l'ADN (Kondo et al., 2010).

2. Implication des PARPs dans les mécanismes de BER/SSBR :

Le BER/SSBR est le mécanisme cellulaire permettant la réparation des cassures simple-brin (SSB : Single Strand Break) et des bases endommagées (BER : Base Excision

Repair). PARP-1 et PARP-2 sont maintenant définies comme des éléments clés dans ce processus de réparation (Caldecott, 2008).

2.1. Mécanisme du BER :

La base endommagée est reconnue par une ADN glycosylase qui clive la liaison N-glycosidique entre la base et le squelette sucre-phosphate, ce qui génère un site abasique ou site AP (Apyrimidique/apurique). L'action d'une AP endonucléase génère alors une cassure SSB. Différentes ADN glycosylases interviennent à ce niveau selon la nature même de la lésion. Les bases endommagées par un agent oxydatif sont traitées par des ADN glycosylases bi-fonctionnelles qui portent une activité endonucléase (ex : OGG1 (8-oxoguanine DNA Glycosylase)) ; les bases alkylées sont quant à elles traitées par des ADN glycosylases mono-fonctionnelles (ex : UDG (Uracil-DNA Glycosylase)). Dans ce dernier cas, la SSB est générée par l'action de l'AP endonucléase APE1 (Apyrimidic/apurinic (AP)-endonuclease). (Almeida and Sobol, 2007). A partir de cette étape, le BER s'engage dans la voie de réparation des SSB (SSBR) qui se subdivise en 2 voies distinctes selon la taille de la lésion :

- réparation par brèche courte ("short-patch") : répare les brèches de 1 nucléotide et fait intervenir l'ADN polymérase β .
- réparation par brèche longue ("long-patch") : répare les brèches de 2 à 12 nucléotides et fait intervenir les ADN polymérases δ et ϵ .

La lésion est détectée par PARP-1 qui s'automodifie et recrute différents facteurs de réparation, dont XRCC1, plate-forme de recrutement protéique, qui est recrutée via son interaction avec le PAR (El-Khamisy et al., 2003). L'hétéromodification de XRCC1 permet ensuite le recrutement de l'ADN Ligase III et de l'ADN polymérase β qui possèdent toutes deux des motifs de liaison au PAR (Masson et al., 1998 ; Lan et al., 2004 ; Mortusewicz and Leonhardt, 2007).

i) Réparation par brèche courte :

Une fois le site AP créé, l'endonucléase APE1 ainsi que l'ADN polymérase β vont former des extrémités 3'-OH et 5'-Phosphate. XRCC1 va stabiliser l'ADN polymérase β qui va combler la brèche d'un nucléotide. La ligation sera effectuée par l'ADN Ligase III dont l'activité est stimulée par le PAR (Leppard et al., 2003).

i) Réparation par brèche longue :

Cette voie de réparation fait intervenir un plus grand nombre d'intervenants.

Les SSB générées par le BER après exposition à des radiations, des ROS ou lors d'un mauvais fonctionnement de la Topoisomérase I peuvent présenter des extrémités 3'-Phosphate, 3'-Phosphoglycolate, 5'-OH ou des extrémités 3'-TopI liées à l'activité de la Topoisomérase I. Ces extrémités d'ADN sont prises en charge par APE1, PNK (dont l'activité est stimulé par XRCC1) ou TDP1 qui les convertissent en extrémités 3'-OH et 5'-Phosphate. Le remplissage de la brèche est ici assuré par les ADN polymérases δ et ϵ , voire l'ADN polymérase β .

En outre, cette voie nécessite également le clivage par FEN1 (Flap Endonuclease 1) des nucléotides déplacés en 5' au cours du remplissage de la brèche, opération stimulée par PARP-1 et PCNA. WRN serait également impliquée dans la stimulation de l'activité de l'ADN polymérase β (Almeida and Sobol, 2007).

Cette voie fait ici appel à l'ADN Ligase I pour la ligation en raison de sa capacité à interagir avec PCNA (Levin et al., 2000) (**figure 10**).

2.2. Implications de PARP-1 et PARP-2 dans le processus du BER/SSBR :

PARP-1 a beaucoup de partenaires protéiques impliqués dans le BER/SSBR.

Elle interagit avec des acteurs des étapes précoces du BER/SSBR que sont l'ADN glycosylase OGG1, l'Aprataxine (APTX) (Almeida and Sobol, 2007), l'organisateur chromatinien Condensine I (Heale et al., 2006) et la protéine chaperone d'histone APLF. Ces 3 dernières protéines ont été décrites comme vraisemblables actrices du BER, mais leurs rôles précis dans ce mécanisme ne sont pas encore cernés.

PARP-1 interagit aussi bien avec des protéines de la réparation par brèche courte (XRCC1, ADN polymerase β et ADN Ligase III) qu'avec un acteur de la réparation par brèche longue (PCNA).

Il a été montré que PARP-2 interagit avec l'ADN polymérase β , XRCC1 et l'ADN Ligase III, des protéines impliquées dans le mécanisme du BER. De plus, des cellules de souris déficientes en Parp-2 présentent une diminution de l'efficacité de réparation de l'ADN alkylé. Ces résultats indiquent une implication de PARP-2 dans la mécanisme de réparation par excision de bases (Schreiber et al., 2002).

Toutefois PARP-2 agirait dans des étapes plus tardives du BER/SSBR. En effet, la cinétique de recrutement de PARP-2 au niveau des sites de cassure est plus lente que celle de PARP-1

et le recrutement de XRCC1 nécessite la présence de PARP-1 mais pas de PARP-2 (Mortusewicz et al., 2007). En revanche, son rôle précis au sein du BER n'a pas encore été identifié.

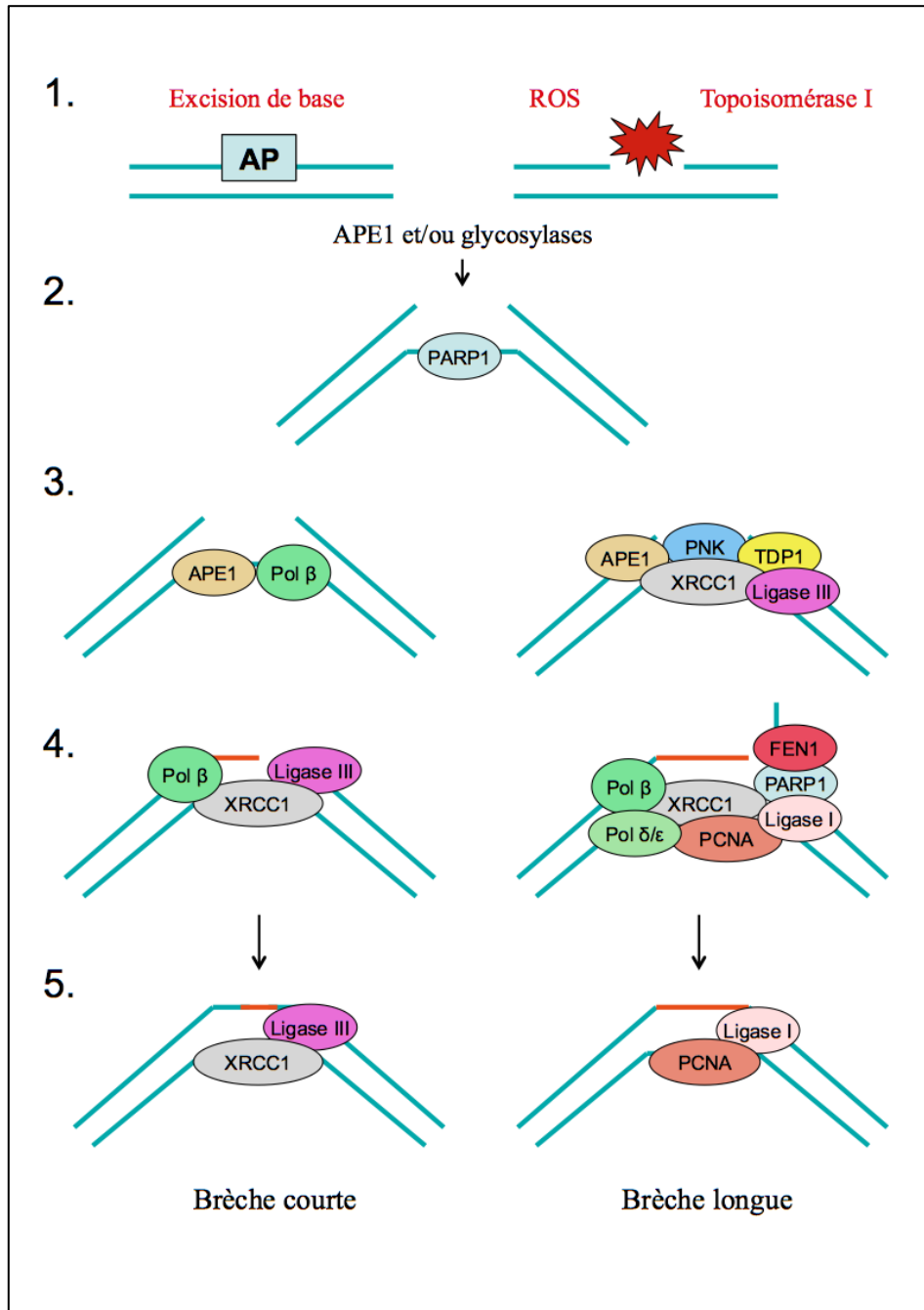


Figure 10 : Schéma simplifié du mécanisme du BER/SSBR : D'après (Caldecott, 2007).

Ce schéma présente les 2 voies de réparation de BER/SSBR, à savoir les voies de réparation par brèches courte et longue.

1) Génération de la SSB ; 2) Détection de la lésion par PARP-1 ; 3) Traitement des extrémités de la cassure ; 4) Remplissage de la brèche ; 5) Ligation achevant la réparation de la lésion.

2.3. Choix de la voie de réparation du BER/SSBR :

Il a été montré que l'absence de PARP-1 a pour conséquence un défaut de synthèse d'ADN au cours de la réparation par brèche courte, et cet impact est encore plus important sur la réparation par brèche longue (Dantzer et al., 2000). PARP-1 agirait de concert avec APE1 et l'ADN polymérase β pour choisir entre les 2 voies de réparation (Sukhanova et al., 2010).

B. Implications des PARPs dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN :

1. Génération des DSB :

Les DSB sont les dommages pouvant être les plus délétères pour la cellule, leur surveillance et leur réparation sont donc primordiales. Leur persistance suite à une réparation défectueuse peut engendrer des mutations ou des aberrations chromosomiques.

Elles peuvent apparaître au cours de la vie cellulaire de façon accidentelle ou programmée (Pfeiffer et al., 2000).

1.1. Les DSB physiologiques :

Les DSB physiologiques sont des cassures dont la génération est nécessaire à des mécanismes cellulaires précis. Ces DSB dites « programmées » sont des intermédiaires de mécanismes cellulaires normaux. Elles peuvent être générées lors de la recombinaison méiotique, de la différenciation des lymphocytes (recombinaison V(D)J), de la commutation de classe des immunoglobulines (CSR : Class-Switch Recombination) ou de l'hypermutation somatique.

1.1.1. Recombinaison V(D)J :

Les cellules lymphocytaires germinales ne sont initialement pas capables de produire les chaînes lourdes des immunoglobulines pour les cellules B et les chaînes lourdes des récepteurs T membranaires pour les cellules T. En effet, les gènes codant pour ces chaînes

lourdes sont présents dans le génome de ces cellules, mais fragmentés sous forme de segments : V pour Variable, D pour Diversité et J pour Jonction.

Le réarrangement de ces segments se fait via la recombinaison V(D)J qui a lieu dans les organes lymphoïdes primaires et qui est une réaction de recombinaison site-spécifique.

Les loci des segments V, D et J sont bordés de motifs appelés séquences-signal de recombinaison (ou RSS pour Recombination Signal Sequences). Ces séquences sont reconnues par des enzymes spécifiques des lymphocytes appelées RAG-1 et 2 (Recombination Activating Gene) qui s'associent et collaborent pour y introduire des DSB. Les séquences comprises entre 2 DSB seront délétées, puis le NHEJ réunifiera les 2 extrémités d'ADN (van Gent et al., 2001).

1.1.2. Commutation de classe des immunoglobulines : (Stavnezer et al., 2008)

Ce phénomène a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires après la rencontre entre le lymphocyte B et un antigène. La commutation de classe des immunoglobulines (ou Class Switch Recombination (CSR)) permet le changement d'isotype des immunoglobulines produites par une cellule B : au cours de ce mécanisme leur régions constantes seront modifiées. En revanche, les séquences codantes pour les régions variables des chaînes des immunoglobulines demeurent inchangées. Ainsi l'affinité de ces dernières pour un antigène donné n'est pas modifiée.

Le CSR permet une délétion de fragments chromosomiques bordés de motifs appelés région de « switch » (ou région S) et au niveau desquels sont générées des DSB par l'action des enzymes AID (Activation-Induced (Cytidine) Deaminase), UNG (Uracil-DNA Glycosylase) et d'APE1/2 (Apyrimidic/apurinic (AP)-endonucleases). AID introduit des lésions dans l'ADN en désaminant des cytosines : il en résulte un mésappariement de bases U:G. Ce mésappariement est détecté et éliminé par les mécanismes du BER ou du MMR (MisMatch Repair) qui transformeront la lésion en DSB (Durandy, 2003 ; Casali and Zan, 2004). Après délétion, les DSB seront là aussi réparées par le NHEJ.

1.1.3. Hypermutation somatique : (Muramatsu et al., 2000 ; Di Noia and Neuberger, 2007)

L'hypermutation somatique a également lieu lors de la rencontre entre la cellule B et un antigène, dans les organes lymphoïdes secondaires. Elle a pour but de réarranger les loci codant pour les régions variables des immunoglobulines. Elle va ainsi permettre l'augmentation de l'affinité des immunoglobulines pour l'antigène rencontré.

L'hypermutation somatique utilise en partie les mêmes mécanismes de mutation/réparation que le CSR. Elle consiste en la substitution de nucléotides au niveau du segment V(D)J préalablement réorganisé. Elle nécessite pour cela l'action de l'enzyme AID ainsi que la formation de DSB (Bross et al., 2000). Ce mécanisme apparaît néanmoins moins bien caractérisé que la recombinaison V(D)J ou le CSR. En effet, le mécanisme générateur de DSB n'est pas encore décrit et le rôle précis de AID dans ce mécanisme n'est pas connu. Il a été proposé que le mécanisme de réparation des DSB générées au cours de l'hypermutation somatique soit le HR, mais faisant appel dans cette situation précise à une (ou plusieurs) ADN polymérase(s) génératrice(s) d'erreurs lors de l'étape finale de ligation (Wu et al., 2003) (**figure 11**).

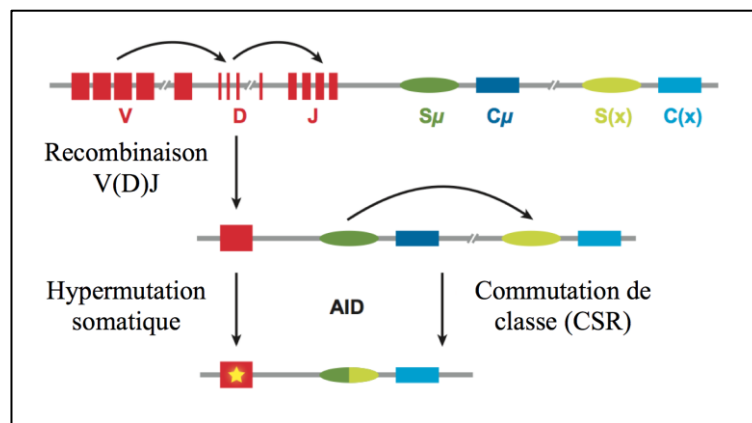


Figure 11 : Schéma des différentes recombinaisons permettant la diversité des immunoglobulines :
D'après (Teng and Papavasiliou, 2007).

La recombinaison V(D)J est la première recombinaison à avoir lieu. L'enzyme AID est essentielle pour le CSR et l'hypermutation somatique ; toutefois ses rôles physiologiques précis dans ces 2 mécanismes ne sont pas encore bien cernés.

V : région Variable ; D : région de Diversité ; J : région de Jonction ; S : région de « Switch » ; C : région Constante

1.1.4. Recombinaison méiotique :

La recombinaison méiotique prend place au cours de la prophase de la méiose I. Elle permet une recombinaison homologe entre les chromosomes homologues afin d'augmenter la variabilité génique. La recombinaison débute par la génération de DSB par Spo11 dont la fréquence d'apparition est corrélée avec la fréquence de conversion génique et de crossing-over (Richardson et al., 2004). Cette enzyme est nécessaire à ce mécanisme ; des souris

déficientes en Spo11 sont stériles et présentent des défauts de mise en place du complexe synaptonémal entre chromatides et des anomalies de recombinaison (Baudat et al., 2000 ; Romanienko and Camerini-Otero, 2000).

La recombinaison qui en résulte se fait préférentiellement entre chromatides sœurs non homologues. En outre, Spo11 est proposé comme recrutant au site de cassure Mre11, impliqué dans les premières étapes de la recombinaison homologe (Neale et al., 2002).

1.2. Les DSB endogènes :

Les DSB endogènes sont produites suite à l'action d'enzymes ou de composés métaboliques.

1.2.1. Action des ROS (Reactive Oxygen Species) :

Comme nous l'avons vu, les ROS sont capables d'oxyder les bases de l'ADN. Cette oxydation des bases de l'ADN peut aboutir à la formation de DSB, mais indirectement. Ces lésions seront détectées et réparées par le mécanisme de réparation par excision de base (BER) créant des sites AP. L'excision simultanée de bases modifiées aboutira à la formation de DSB si les 2 sites AP générés sont proches spatialement et situés sur 2 brins d'ADN opposés (Pfeiffer et al., 2000 ; Cooke et al., 2003).

1.2.2. Action des Topoisomérases :

Les Topoisomérases de type II génèrent également des DSB transitoires pour permettre la relaxation de la double-hélice d'ADN, ce qui permet la transcription, la réplication et la recombinaison des chromatides. Le nombre de DSB endogènes liées à la réplication dans des cellules humaines normales est estimé entre 10 et 50 DSB par cellule et par cycle (Haber, 1999 ; Vilenchik and Knudson., 2003).

1.2.3. Réplication d'une SSB non réparée :

Malgré l'existence de mécanismes de surveillance de l'intégrité du génome, il peut arriver que des SSB (quelle que soit leur origine) ne soient pas détectées et demeurent donc non réparées. La fourche de réplication se déplace au cours de la phase S et peut rencontrer

une SSB. Il s'ensuit une DSB au niveau de cette fourche, ce qui a pour conséquence de la bloquer.

Si la SSB se trouve sur le brin d'ADN précoce (ou direct), une DSB à extrémités franches sera générée. Si la SSB se trouve sur le brin retardé (ou indirect), une DSB à extrémités cohésives sera générée (**figure 12**).

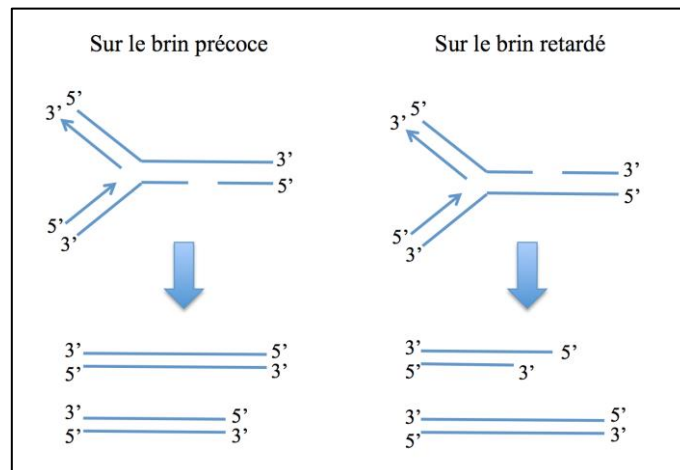


Figure 12 : Schéma de la réplication d'une SSB :

Le brin précoce est créé de manière continue, dans le sens 5' vers 3'. Le brin retardé est créé de manière discontinue sous forme de fragments d'Okazaki, dans le sens 5' vers 3'.

1.3. Les DSB exogènes :

Les DSB exogènes sont des dommages apparaissant suite à l'exposition de la cellule à des agents clastogènes générateurs de DSB.

1.3.1. Radiations ionisantes :

Les radiations ionisantes (telles les rayons X et γ) peuvent générer des SSB qui, si elles sont suffisamment proches spatialement et localisées sur des brins opposés, donneront naissance à des DSB. Les rayons X par exemple génèrent 25 SSB pour 1 DSB ().

1.3.2. Agents chimiques : (figure 13)

Plusieurs agents chimiques générateurs de dommages dans l'ADN peuvent induire la formation de DSB. C'est le cas des radiomimétiques que sont la Bléomycine ou la Néocarzinostatine.

La Bléomycine est capable de se complexer avec du fer ou de l'oxygène. Cette association produit des espèces réactives qui vont attaquer l'ADN. La nature de ces espèces n'est pas encore connue mais aboutit à la perte de bases et au clivage de la charpente de sucre-phosphate de l'ADN. La Bléomycine produit majoritairement des DSB mais également des SSB, à raison de 6 DSB pour 1 SSB (Burger et al., 1981).

La Néocarzinostatine est une protéine contenant un chromophore qui s'intercale entre 2 bases adjacentes. Son interaction avec des agents réducteurs va permettre le clivage du brin d'ADN. La Néocarzinostatine produit essentiellement des SSB mais également des DSB (Boye et al., 1984).

D'autres agents peuvent quant à eux bloquer le complexe ADN/Topoisomérase II, conduisant à une formation de DSB au cours de la réplication : c'est le cas de l'Etoposide. Cette dernière va établir des liaisons hydrogène covalentes avec l'ADN et former ainsi un complexe ternaire avec l'ADN et la Topoisomérase II. De fait, la religation de l'ADN est empêchée : la DSB générée par la Topoisomérase II est donc maintenue.

« Etoposide protein bound DSB »

De façon intéressante, il a été montré que CtIP et le complexe MRN, pourtant impliqués dans la recombinaison homologe, chassent l'Etoposide au niveau de la DSB, permettant ensuite sa réparation par le mécanisme du NHEJ (Quennet et al., 2011). (Les mécanismes de réparation des DSB seront décrits ci-après)

En outre, une production de radicaux libres au cours du métabolisme de l'Etoposide a été observée. Ces métabolites peuvent ainsi générer des SSB dans l'ADN. Des études ont en effet montré que l'Etoposide peut générer des sites AP dans des cellules sanguines par l'intermédiaire de ces radicaux (Rojas et al., 2009).

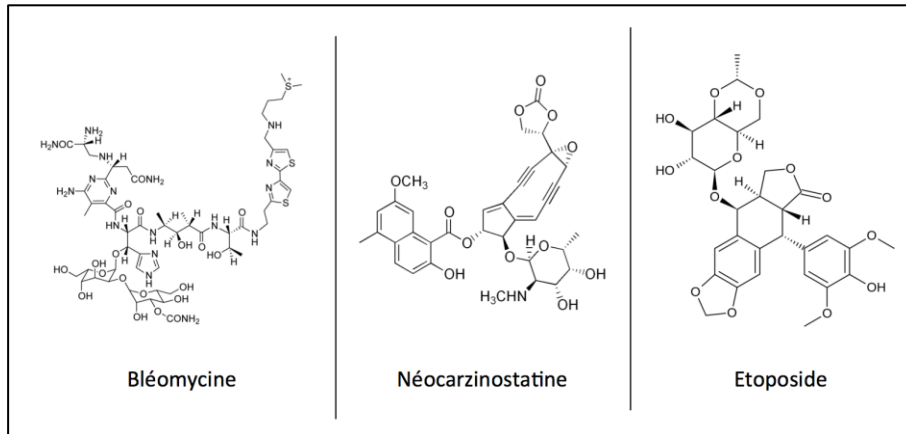


Figure 13 : Structure des agents chimiques Bléomycine, Néocarzinostatine et Etoposide :

La structure de la Bléomycine présentée ici correspond à sa forme sulfatée.

2. Les mécanismes de réparation des DSB :

La cellule dispose de deux mécanismes de réparation distincts pour éliminer les DSB au sein du génome : la recombinaison non-homologue (NHEJ : Non-Homologous End-Joining), qui a lieu tout au long du cycle cellulaire, et la recombinaison homologue (HR : Homologous Recombination), qui n'a lieu qu'en phases S et G2.

Ces voies de réparation sont assez complexes dans leurs cheminements et toutes les interactions entre les différents intervenants ne sont pas forcément encore connues. De même, plusieurs intervenants restent peut-être (et même sans doute) à identifier pour affiner au mieux la cascade de réactions et de recrutement ayant lieu dans chacun des mécanismes (Rass et al., 2012 ; De Vos et al., 2012).

2.1. La recombinaison homologue (HR : Homologous Recombination) :

Suite à la génération de la DSB, 53BP1 est recrutée pour protéger les extrémités de l'ADN. Cette fixation est rapide et servirait également à empêcher le déclenchement du HR en inhibant CtIP. Ce point sera plus détaillé dans le paragraphe 2.4 sur le choix NHEJ/HR.

53BP1 est ensuite chassée par BRCA1. En phase S, CtIP est phosphorylée ce qui permet son interaction avec Mre11 et BRCA1. BRCA1 interagit avec CtIP et la poly-ubiquitinylation pour

vraisemblablement réguler son activité (Yu et al., 2006). CtIP active la fonction endonucléasique de Mre11. Il en résulte une résection ménagée des extrémités de l'ADN. Cette activité endonucléasique sera ensuite inhibée et la résection est poursuivie par Exo1.

Les régions simple-brin ainsi générées sont protégées par RPA, qui peut être phosphorylé par ATM et DNA-PK pour éviter sa localisation au niveau des foyers de réplication et la rediriger ainsi vers les sites de dommages (Wang et al., 2001). BRCA2 est ensuite recrutée, puis déplace RPA et charge RAD51 à la place, ce qui formera un nucléofilament capable de venir envahir la chromatide sœur. Ceci forme une structure appelée D-Loop ; cette formation est stabilisée par RAD54.

L'ADN polymérase δ débute la synthèse d'ADN, ce qui transforme la D-Loop en jonction de Holliday. La cassure dans l'ADN est finalement réparée par l'ADN polymérase δ . Après réparation, des résolvases et des dissolvases reconnaissent les jonctions de Holliday et les résolvent. Enfin, BLM et la Topoisomérase III peuvent intervenir pour éviter la génération de crossing-over (**figure 14**).

2.2. La recombinaison non-homologue (NHEJ : Non-Homologous End-Joining) :

Le NHEJ est un mécanisme de réparation des DSB pouvant avoir lieu à tout moment au cours du cycle cellulaire. Il ne nécessite pas de chromatide sœur comme modèle pour fonctionner, contrairement au HR : il consiste en une « simple » jonction entre les deux extrémités de la cassure dans l'ADN. Le NHEJ est donc le mécanisme de réparation majeur des DSB en phase G1 et au début de la phase S.

Ce mécanisme se veut rapide, mais a été initialement décrit comme générateur d'erreurs au sein du génome. Si cela joue un rôle non négligeable dans les processus d'évolution, cela peut également conduire à des mutations déclenchant une éventuelle tumorigénèse.

Mais la réalité est en fait bien plus complexe, car le NHEJ n'est pas une seule voie de réparation des DSB dans la cellule, mais un terme générique englobant 2 mécanismes distincts : le NHEJ dit « classique » et le NHEJ dit « alternatif ». Ces deux voies diffèrent tant par les protéines qu'elles font intervenir que par leur fidélité et leur rapidité.

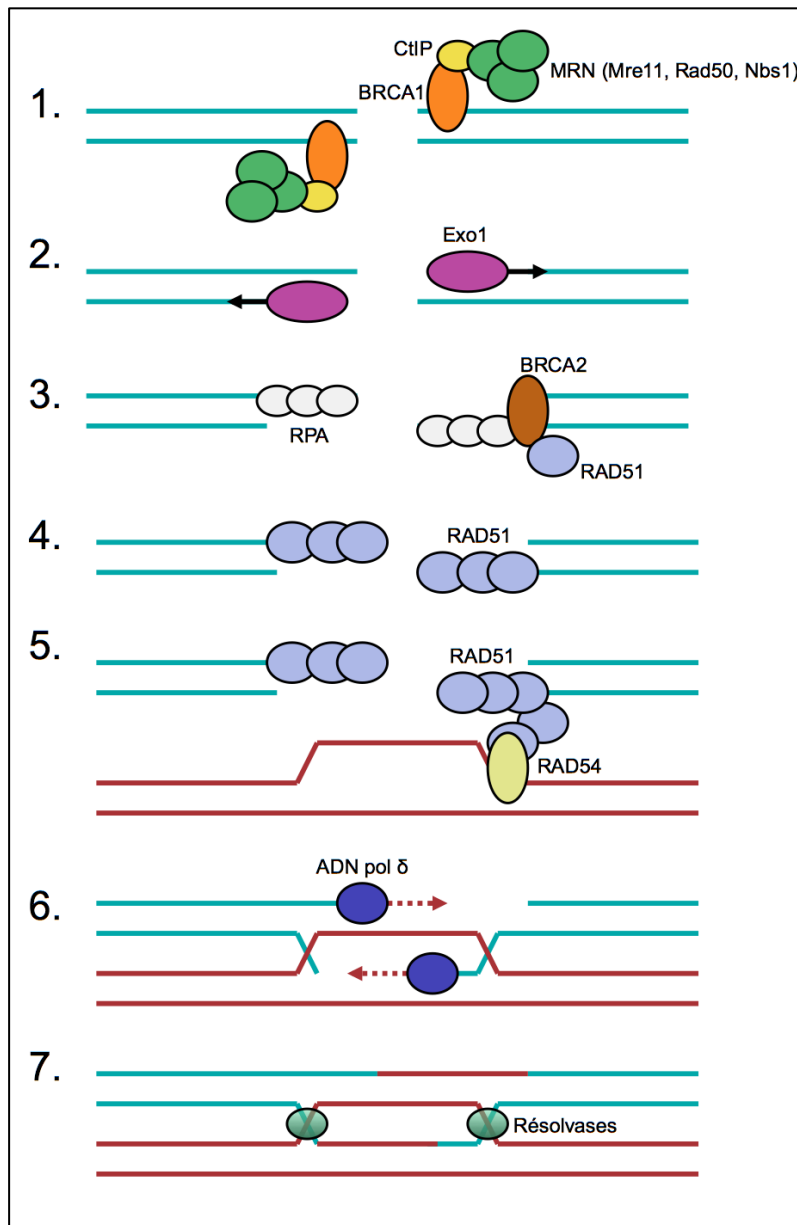


Figure 14 : Schéma simplifié du mécanisme de Recombinaison Homologue :

- 1) Localisation de la DSB, recrutement de BRCA1, CtIP et du complexe MRN, puis digestion ménagée de l'ADN par Mre11.
- 2) Résection poursuivie par Exo1.
- 3) Protection des extrémités simple-brin par RPA.
- 4) Déplacement de RPA par BRCA2 et remplacement par RAD51, d'où formation d'un nucléofilament.
- 5) Invasion de la chromatide sœur par le nucléofilament et formation de la D-Loop via RAD54.
- 6) Formation de la jonction de Holliday et synthèse d'ADN par l'ADN polymérase δ .
- 7) Résolution de la jonction de Holliday par des résolvases ; BLM et Topoisomérase III évitent les crossing-over.

Plusieurs noms ont été attribués à ces 2 voies au fil du temps :

- NHEJ Classique : NHEJ canonique, C-NHEJ (classical-NHEJ), D-NHEJ (DNA Ligase IV-dependent NHEJ)
- NHEJ Alternatif : A-NHEJ (alternative NHEJ), B-NHEJ (Backup NHEJ)

Dans un souci de clarté, seules les dénominations « NHEJ Classique » et « NHEJ Alternatif » seront utilisées dans ce manuscrit.

2.2.1. Le NHEJ Classique :

Le NHEJ Classique (ou C-NHEJ), comme le suggère son épithète, est le premier mécanisme de NHEJ qui a été décrit. Son bon déroulement nécessite globalement trois complexes majeurs :

- i) l'hétérodimère formé par Ku70 et 80
- ii) la sous-unité catalytique de DNA-PK, DNA-PKcs, associée à la nucléase Artémis
- iii) le complexe de ligation à proprement parlé formé de XRCC4 et ADN Ligase IV

En premier lieu, le dimère Ku70/80 procède à la reconnaissance des extrémités de la DSB et encercle l'ADN pour le protéger d'une éventuelle dégradation. Le complexe DNA-PK est formé suite au recrutement de son unité catalytique DNA-PKcs (DNA-PK est constitué de l'hétérodimère Ku70/80 et de DNA-PKcs) et procède à la phosphorylation du variant d'histone H2AX, ce qui a pour effet de relaxer la chromatine à proximité de la cassure. A partir de ce moment, 2 cas de figure peuvent se présenter :

- i) les 2 extrémités juxtaposées de la cassure peuvent être liguées directement
- ii) les 2 extrémités ne peuvent pas être liguées efficacement en tant que telle

Dans le premier cas, le processus de ligation est assuré directement par l'ADN Ligase IV couplée à XRCC4 et qui sera recrutée au niveau de DNA-PK.

Dans le second cas, un ballet plus complexe d'intervenants se met en place. Il y a d'abord « nettoyage » des extrémités 5'-phosphate et 3'-OH de la cassure double-brin par la Poly-Nucleotide Kinase (PNK) via ses activités phosphatase et kinase. Suite à ce nettoyage, DNA-PK s'autophosphoryle, recrute la protéine Artemis et la phosphoryle à son tour, ce qui permet son activité endonucléasique. Artemis va digérer les structures en épingle à cheveu situé entre les double- et simple-brins de l'ADN. En outre, la digestion des extrémités de la lésion est également assurée par le complexe MRN et surtout par Mre11 sous le contrôle de

CtIP. Cette résection participe au maintien de l'alignement des extrémités de la cassure. Les extrémités simple-brin ainsi générées peuvent ensuite être transformées en extrémités double-brin par l'action des ADN polymérases λ et μ qui sont recrutées via leurs domaines BRCT au niveau du complexe Ku. Une fois que les 2 extrémités double-brin ont été préparées, elles peuvent être liguées par le complexe ADN Ligase IV/XRCC4 dont l'activité est stimulée par XLF (XRCC4 Like Factor, également appelé Cernunnos) recrutée via les protéines Ku (**figure 15**).

Il est à noter que la protéine APLF (Aprataxin and Polynucleotide kinase-Like Factor) a été identifiée comme interagissant avec Ku, ADN Ligase IV/XRCC4, comme capable de se lier au PAR, et comme facilitant le mécanisme de NHEJ Classique (Rulten et al., 2011). APLF est substrat d'ATM et sa déplétion dans des cellules humaines induit des difficultés de réparation des DSB via le NHEJ Classique (Macrae et al., 2008). Toutefois son rôle précis dans ce mécanisme de réparation n'a pas encore été déterminé.

2.2.2. Le NHEJ Alternatif :

Le NHEJ Alternatif (ou A-NHEJ, ou B-NHEJ) est une notion récente et est un mécanisme de réparation qui n'est peut être pas encore totalement caractérisé.

L'hypothèse de l'existence d'un troisième mécanisme de réparation des DSB a été émise suite à plusieurs observations :

- des extraits cellulaires déficients en DNA-PKcs ou Ku sont capables d'effectuer des réactions de ligation de DSB *in vitro* (Wang et al., 2003).
- l'absence de l'ADN Ligase IV n'empêche pas la recircularisation d'un plasmide linéarisé *in vivo* (Wang et al., 2005).

Ces études montraient donc l'existence d'une voie ne faisant pas appel aux acteurs connus du NHEJ (à savoir Ku, DNA-PK et ADN Ligase IV/XRCC4) mais qui est active lorsque le NHEJ n'est plus opérationnel.

Cette voie de réparation a donc été initialement décrite comme une voie de secours permettant à une cellule ne disposant pas d'un NHEJ fonctionnel de survivre malgré cela et sans pour autant devoir faire appel au HR. Cette voie a été appelée « Backup-NHEJ » (ou B-NHEJ) en référence à son rôle de voie de secours. La dénomination de NHEJ Alternatif est également apparue. Pour désigner la voie du NHEJ précédemment connu, le terme de NHEJ Classique a alors été choisi.

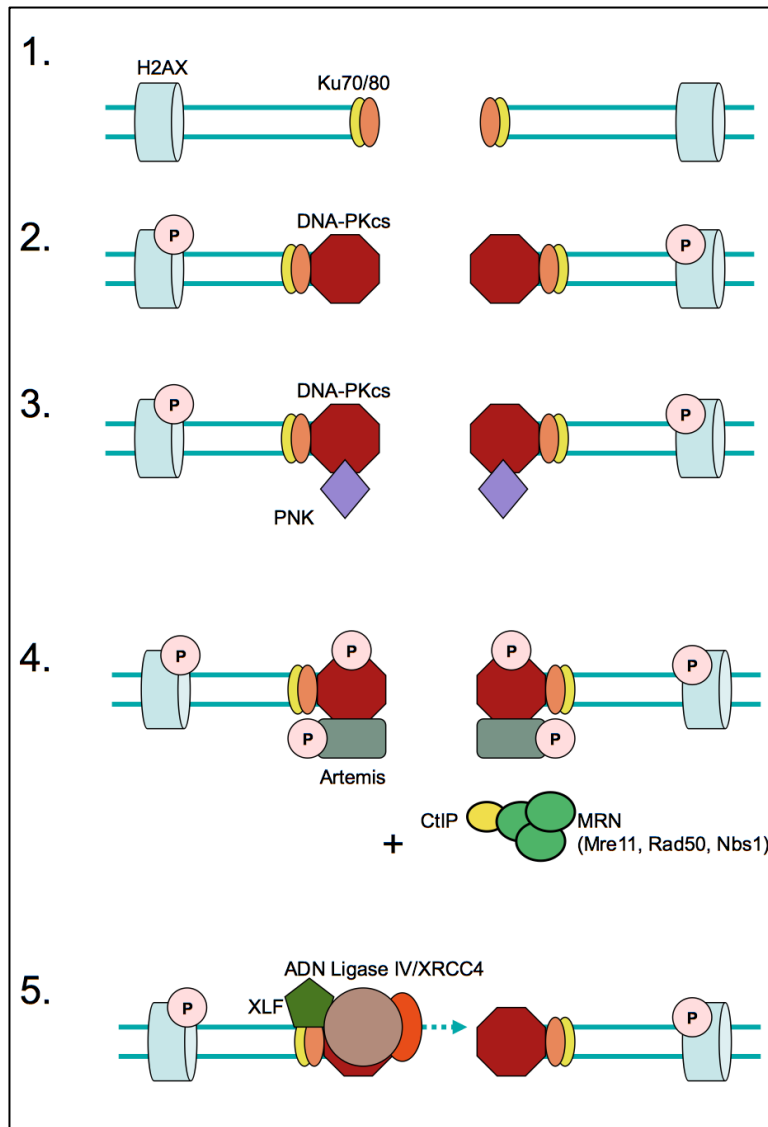


Figure 15 : Schéma simplifié du mécanisme du NHEJ Classique :

1) Protection des extrémités par le dimère Ku70/80.

2) Recrutement de DNA-PKcs, ce qui forme DNA-PK fonctionnel qui va phosphoryler H2AX pour relaxer la chromatine.

3) Si les extrémités juxtaposées peuvent être liguées directement, on passe directement à l'étape 5.

Sinon, il y a nettoyage des extrémités par PNK qui arrange les extrémités 5' et 3'. Puis 4) DNA-PK s'autophosphoryle et phosphoryle Artémis, ce qui active sa fonction endonucléasique et digère les structures en épingle à cheveu. Dans le même temps, le complexe MRN procède à une résection via Mre11 dont l'activité est contrôlée par CtIP. Enfin, les ADN polymérase λ et μ sont recrutées au niveau du complexe Ku et transforment les simple-brins sortants en double-brins.

5) Recrutement du complexe ADN Ligase IV/XRCC4 au niveau du complexe Ku. Ce recrutement est facilité par XLF (= Cernunnos). Le complexe ADN Ligase IV/XRCC4 est stimulé par XLF.

Toutefois la réalité n'est pas aussi simple car des études ont montré que dans certains cas, le NHEJ alternatif paraît privilégié au NHEJ classique, même si celui-ci est fonctionnel. (voir 2.4). Le NHEJ alternatif apparaît donc non plus comme une simple voie de secours « en attente » d'une défaillance du NHEJ classique mais bien d'une voie disposant de son propre rôle et champ d'action dans certains mécanismes cellulaires.

Le NHEJ alternatif apparaît ainsi comme un mécanisme cellulaire bien plus complexe qu'il ne paraissait au premier abord.

Certains acteurs de cette voie ont pu être mis en évidence parmi lesquels PARP-1 (Mansour et al., 2010), PNK (Audebert et al., 2006) et XRCC1 et l'ADN Ligase III (Audebert et al., 2004 ; Wang et al., 2005). Aspect pour le moins curieux et intéressant, ces protéines sus-citées ont surtout été décrites comme intervenant dans les mécanismes de réparation des cassures simple-brin de l'ADN via le processus BER (PARP-1, XRCC1, ADN Ligase III, PNK) ou dans le NHEJ Classique (PNK). Il semblerait donc qu'elles soient capables de passer d'une voie cellulaire à une autre en fonction des besoins.

Le problème majeur posé par le NHEJ alternatif est qu'il est moins bien caractérisé que les autres voies de réparation des DSB. Toutefois, des études successives ont permis une ébauche de mécanisme séquentiel.

Des tests de ligation *in vitro* ont déterminé que l'histone H1 était impliqué dans le mécanisme du NHEJ Alternatif. Les auteurs ont proposé que cet histone intervient pour maintenir les 2 extrémités de la DSB alignées pour faciliter la future étape de jonction. De plus, la présence de l'histone H1 stimule l'activité de PARP-1 (Rosidi et al., 2008).

L'utilisation d'inhibiteur de PARP-1 dans des cellules déficientes en ADN Ligase IV ou en dimère Ku a pour effet de diminuer fortement la réparation des DSB, indiquant un rôle fonctionnel de PARP-1 et de son activité dans le NHEJ Alternatif (Audebert et al., 2004). Il a été proposé dans cet article que l'automodification de PARP-1 permet le recrutement de XRCC1 amenant avec elle l'ADN Ligase III. PNK serait de même recrutée pour le traitement préalable des extrémités de la DSB grâce à ses activités 5'-ADN kinase et 3'-ADN phosphatase.

Le complexe MRN serait également impliqué dans le NHEJ Alternatif. L'activité nucléase de Mre11 favoriserait même ce mécanisme de réparation par rapport au NHEJ Classique (Rass et al., 2009) (**figure 16**).

Dans le cas où les extrémités de la cassure sont plus complexes à arranger, une nucléolyse et une synthèse d'ADN peuvent être nécessaires. Il se pourrait que ces rôles soient tenus respectivement par :

- l'enzyme WRN (Werner syndrome protein helicase) dont l'activité 3'-5' endonucléase et 3'-5' hélicase est vraisemblablement régulée par PARP-1. En effet, il a été montré que WRN peut être stimulée par l'automodification de PARP-1 (von Kobbe et al., 2004).
- l'ADN polymérase β , qui a été décrite comme interagissant avec XRCC1 lui-même recruté par PARP-1 (Caldecott et al., 1996).

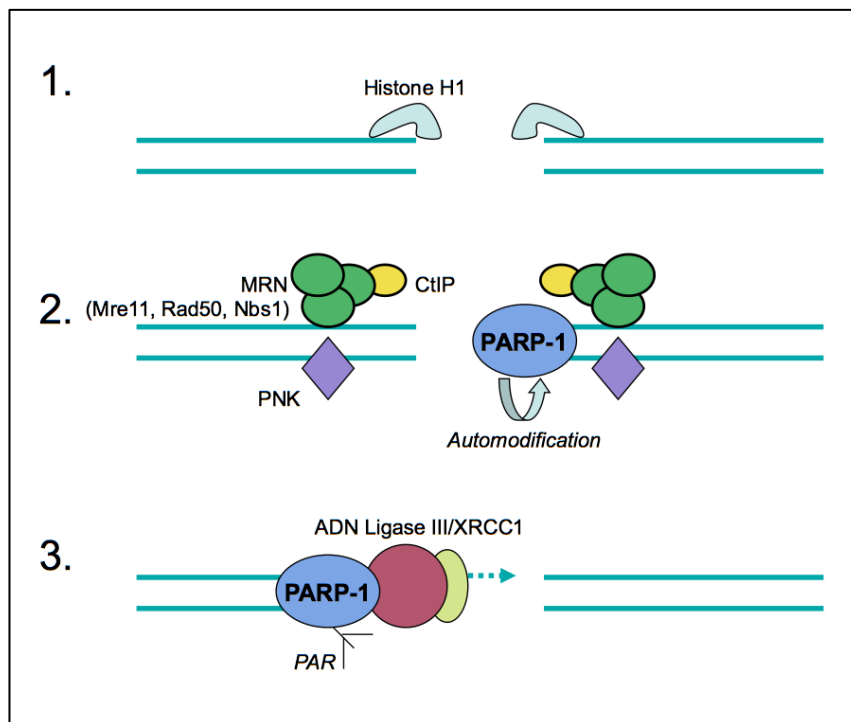


Figure 16 : Schéma simplifié du mécanisme du NHEJ Alternatif :

- 1) Maintien de la présence de l'histone H1 en absence du complexe Ku. H1 maintient les extrémités de la cassure.
- 2) Recrutement de PNK, résection des extrémités par le complexe MRN et recrutement de PARP-1 qui s'automodifie.
- 3) Intervention de WRN et ADN polymérase β si nécessaire, recrutement de XRCC1 et de l'ADN Ligase III par PARP-1, ligation. (PAR : Poly(ADP)ribose)

2.3. Le NHEJ Alternatif, un mécanisme qui bouleverse les conventions :

Le NHEJ a souvent été décrit comme « error prone » et le HR comme « error free », mais la réalité se veut pour autant beaucoup plus nuancée. Il est admis que le HR respecte la

structure originelle de l'ADN qu'il répare, et pour cause puisqu'il dispose d'un exemple d'ADN non altéré en la chromatide sœur générée suite à la réplication. La nuance se retrouve donc dans les 2 mécanismes du NHEJ.

En effet, il s'avère que le mécanisme de réparation par le NHEJ Classique est conservatif, et est donc une méthode de réparation intrinsèquement fidèle, contrairement à ce qui avait été pensé précédemment. La mutagénèse qui peut résulter de son action viendrait de l'absence de complémentarité des extrémités qu'il doit liguer (Guirouilh-Barbat et al., 2007). Ce mécanisme est de plus considéré comme rapide.

Le NHEJ Alternatif quant à lui a la particularité de pouvoir faire appel à des microhomologies pour se réaliser (**figure 17**), ce qui est potentiellement générateur de délétions. Ce processus n'est donc pas un mécanisme de réparation fidèle des DSB. De plus, tout comme le HR, c'est un mécanisme de réparation lent.

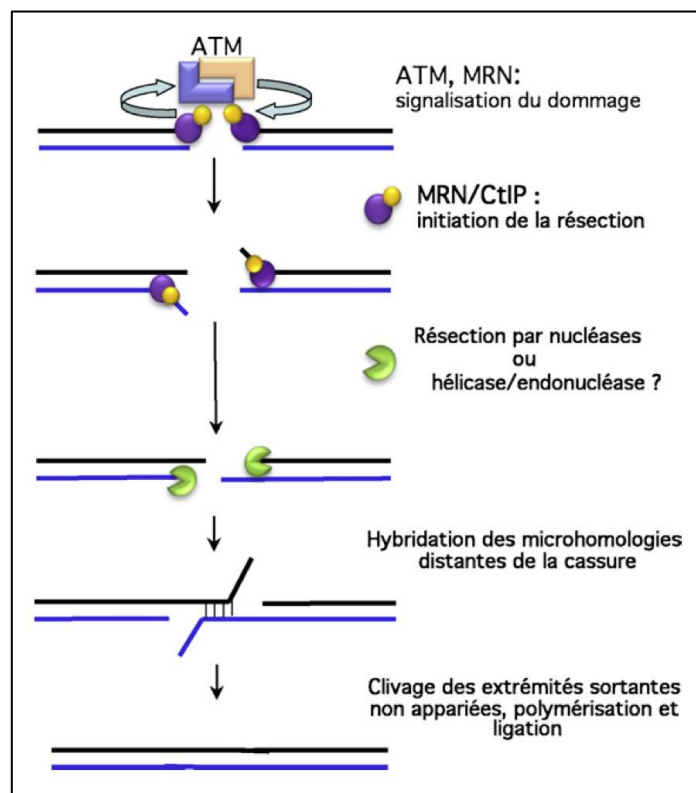


Figure 17 : Schéma de ligation au cours du NHEJ Alternatif : (Rass et al., 2012)

Suite à la résection des extrémités de la cassure, une hybridation des microhomologies peut avoir lieu, ce qui génèrera des extrémités sortantes non appariées. Ces extrémités seront alors clivées, d'où délétion de nucléotides.

Au final il apparaîtrait donc que les erreurs pouvant être commises par le mécanisme de NHEJ lors de la réparation sont en fait dues essentiellement au NHEJ Alternatif et non au NHEJ Classique. Si l'on fait la distinction entre NHEJ Classique et Alternatif, il existe donc grossièrement 2 mécanismes de réparation fidèle (le HR et le NHEJ Classique) et 1 mécanisme de réparation générateur d'erreurs (le NHEJ Alternatif).

2.4. Interconnexions entre les 3 voies de réparation :

Les 3 voies de réparation des DSB décrites ci-dessus (HR, NHEJ Classique et Alternatif) peuvent entrer en compétition car leur substrat demeure le même : la DSB.

2.4.1. Choix du mécanisme de réparation des DSB en phase G1 :

Les NHEJ Classique et Alternatif sont susceptibles d'intervenir tout au long du cycle cellulaire. Il a été proposé que la fixation de Ku70/80 aux extrémités de la cassure déplace l'histone H1, permettant le recrutement de DNA-PKcs. Dans ce cas de figure, la voie Classique du NHEJ est préférée (Rosidi et al., 2008). En absence de Ku70/80, l'histone H1 demeure et la voie Alternative du NHEJ est déclenchée.

Il a également été montré que Ku entre en compétition avec PARP-1 pour se fixer au niveau des extrémités de l'ADN (Cheng et al., 2011). Or Ku ayant une affinité supérieure à PARP-1 pour les extrémités double-brin, le NHEJ Classique est de fait préféré au NHEJ Alternatif si l'hétérodimère est présent (Wang et al., 2006). Ku est ainsi décrit comme étant l'élément principal du choix cellulaire entre les NHEJ Classique et Alternatif (Fattah et al., 2010) (**figure 18**).

Cette compétition entre NHEJ Classique et Alternatif a également lieu lors des phénomènes de commutation de classe des immunoglobulines dans les lymphocytes B. La commutation de classe est un réarrangement de séquences nucléotidiques ayant lieu après la génération de DSB programmée et réalisée par AID. Lors de la réparation de ces cassures, les 2 mécanismes peuvent avoir lieu mais il est proposé que les extrémités de cassures pouvant être liguées rapidement le sont par le NHEJ Classique, tandis que celles nécessitant une recherche d'homologie et le clivage de nucléotides non-homologues sont réparées par le NHEJ Alternatif (Yan et al., 2007 ; Robert et al., 2009).

En outre, il a été montré que 53BP1 joue un rôle dans le choix du NHEJ Classique au cours de la commutation de classe en interférant au niveau de l'étape de résection. En son absence, la résection de l'ADN est accrue et la ligation fait intervenir des microhomologies, donc vraisemblablement le NHEJ Alternatif (Bothmer et al., 2010).

Concernant le mécanisme de recombinaison somatique V(D)J déclenché lors de la maturation des lymphocytes, il semblerait que le NHEJ Classique soit préféré pour liguer l'ADN après réarrangement (Malu et al., 2012).

La théorie générale actuelle de sélection de l'un ou l'autre des mécanismes du NHEJ est de fait basée sur la nature même des extrémités de la DSB à réparer. De façon très imagée, le NHEJ s'adapte à la cassure : si celle-ci présente des extrémités relativement « propres », le NHEJ Classique est utilisé et la réparation ne génère pas d'erreur ; tandis que si la cassure présente des extrémités « compliquées », le NHEJ Alternatif est préféré mais fera apparaître des modifications de séquence.

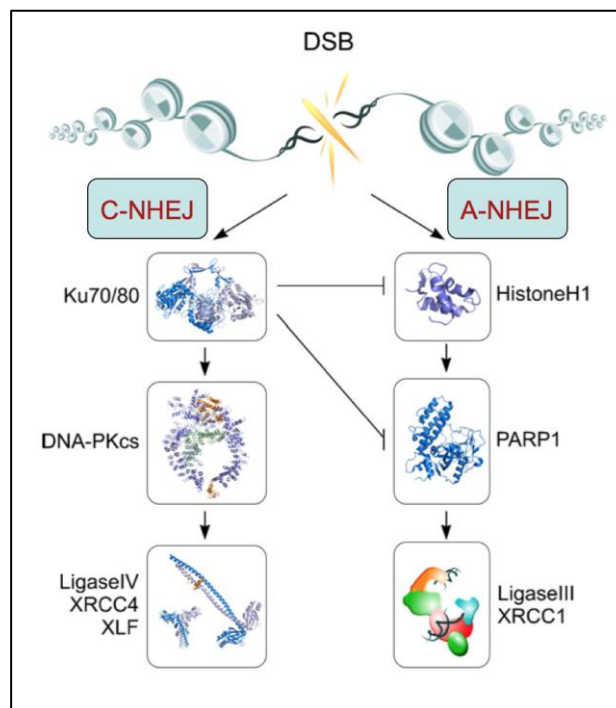


Figure 18 : Interconnexion des voies Classique et Alternative du NHEJ : D'après (Mladenov and Iliakis, 2011).

La compétition entre l'hétérodimère Ku70/80 (C-NHEJ : NHEJ Classique) et l'histone H1 et PARP-1 (A-NHEJ : NHEJ Alternatif) pour la reconnaissance des extrémités de la DSB détermine quelle voie de réparation sera utilisée aux dépens de l'autre.

2.4.2. Choix du mécanisme de réparation des DSB en phases S et G2 :

Au cours des phases S et G2, les 3 mécanismes de réparation sont disponibles. Le HR entre alors en compétition avec le NHEJ. Des études indiquent que le choix entre ces 2 voies se fait au niveau de la résection des extrémités de l'ADN. En effet, CtIP (ainsi que BRCA1) intervient dans le phénomène faisant basculer les mécanismes de réparation des DSB du NHEJ en phase G1 au HR en phases S et G2 (Huertas and Jackson, 2009 ; Yun and Hiom, 2009).

De plus, 53BP1 jouerait également un rôle central dans le choix cellulaire entre NHEJ et HR : cette protéine serait capable d'inhiber l'activité de CtIP et du même coup d'empêcher le processus de résection ménagée exécuté par le complexe MRN, étape d'initiation du HR. Cette inhibition aurait lieu en absence de BRCA1, soit au cours de la phase G0/G1. Au cours de la phase S, BRCA1 serait capable d'empêcher 53BP1 d'inhiber CtIP par un mécanisme encore non identifié, ce qui permettra le déclenchement du HR (Aly and Ganesan, 2011).

Un autre exemple de régulation existe à travers la Nucleoporine 153 (NUP153). C'est un composant des pores nucléaires chez les mammifères, qui pourrait réguler la balance entre HR et NHEJ en favorisant clairement la mise en place du NHEJ. Son absence diminue fortement l'efficacité du NHEJ *in vivo*, tandis que sa déplétion augmente très significativement l'efficacité du HR après dommage. Elle promeut la localisation nucléaire de 53BP1 en autorisant son importation dans le noyau et permet ainsi la formation de foyers de recrutement de cette protéine après génération de DSB. Il se pourrait donc que ce soit via le recrutement de 53BP1 que le HR est inhibé (Lemaître et al., 2012).

En outre, la voie du HR est inhibée par le complexe Ku dans des cellules DT40 déficientes en PARP-1 et dépourvues de PARP-2. PARP-1 lèverait le blocage du HR induit par Ku dans ces cellules, ce qui suggère une compétition entre Ku et PARP-1 aussi bien au sein des NHEJ Classique et Alternatif mais également entre le NHEJ et le HR (Hochegger et al., 2006).

3. PARPs et réparation des cassures double-brin de l'ADN :

Les PARPs peuvent être impliquées dans les dispositifs de surveillance de l'intégrité du génome, comme nous l'avons vu précédemment. Elles interviennent au cours de la réparation des SSB, mais sont également sollicitées au cours de la réparation des DSB.

3.1 PARP-1 et PARP-2 dans la réponse cellulaire aux DSB :

Comme nous l'avons vu, PARP-1 est désormais considérée comme actrice du mécanisme de réparation des DSB appelé NHEJ Alternatif.

En revanche, peu d'éléments expérimentaux sont connus à ce jour sur le rôle de PARP-2 dans la réparation des DSB. Des études de Nicolás et al. (Nicolás et al., 2010) ont montré une accumulation de DSB dans des thymocytes murins déficient en Parp-2. De plus, une interaction entre PARP-2 et Ku a pu être observée, sous-entendant un possible rôle de PARP-2 dans le mécanisme du NHEJ dit Classique et donc dans la réparation des DSB (Yélamos et al., 2008). Toutefois, son rôle précis reste à élucider.

3.2. PARP-1 et PARP-2, actrices du HR lors d'un blocage de la fourche de réplication :

Des études du laboratoire de Helleday T. ont montré qu'une exposition de cellules à de l'hydroxyurée, qui a pour effet une réduction du stock cellulaire de dNTP (désoxy-Nucléotides TriPhosphate) et un blocage des fourches de réplication, déclenche l'activité de poly(ADP-ribosyl)ation de PARP-1 et 2. Cette activité va permettre le recrutement de la protéine Mre11 du complexe MRN et le déclenchement du mécanisme du HR qui permettra le redémarrage de la fourche de réplication. Ces travaux suggèrent que PARP-1 et PARP-2 ont un rôle spécifique dans le HR associé au redémarrage des fourches de réplication, tout en n'étant pas acteurs du HR en tant que tel (Bryant et al., 2009).

IV. PARPs et division cellulaire

La mitose est un événement essentiel dans la vie et la survie cellulaires. Elle met en jeu des mécanismes complexes dont le but final est une ségrégation correcte du matériel génétique entre les deux cellules filles.

Les PARPs, et donc par conséquence le PAR, sont impliquées dans les processus de division cellulaire. Pas moins de 6 PARPs sont retrouvées associées aux structures de l'appareil mitotique : PARP-1, 2, 3, VPARP et les 2 Tankyrases (Smith, 2001). PARG est également retrouvée au niveau du fuseau mitotique, ce qui est vraisemblablement signe d'une grande dynamique de la synthèse/dégradation de PAR dans cette structure qui est fondamentale pour la bonne marche de la division cellulaire.

A. Les PARPs impliquées dans les processus mitotiques :

1. PARP-1 et PARP-2 :

Il a été montré que PARP-1 et 2 interagissent et sont associées aux protéines des kinétochores CENPA et CENPB, ainsi qu'à la protéine BUB3 surveillant l'assemblage du fuseau mitotique et pouvant également être localisée au niveau des kinétochores (Saxena et al., 2002a ; Saxena et al., 2002b). Il a été observé que ces 3 protéines sont poly(ADP-ribosyl)ées après induction de dommages dans l'ADN, suggérant que ces PARPs jouent un rôle essentiel dans la maintenance des kinétochores et de fait dans la ségrégation de l'ADN. D'autant que des fibroblastes issus de souris déficientes en *parp2* présentent des anomalies des kinétochores et une ségrégation incorrecte des chromosomes au cours de la mitose (Ménissier de Murcia et al., 2003).

En outre, des études ont montré que PARP-1 était également localisée au niveau du centrosome et est capable d'y poly(ADP-ribosyl)er des protéines centrosomales parmi lesquelles le suppresseur de tumeur p53. Ce dernier peut interagir avec PARP-1, être hétéromodifié par cette enzyme et peut être localisé au niveau du centrosome pour y réguler sa duplication. De plus, l'absence ou l'inhibition de PARP-1 induit une amplification centrosomale. Les auteurs émettent donc l'hypothèse que PARP-1 est capable via son activité

de participer au maintien de l'intégrité centrosomale en régulant les phénomènes de duplication de cet organe à travers p53 (Kanai et al., 2003).

2. PARP-4 :

VPARP est localisée au niveau du fuseau mitotique au cours de la division cellulaire (Kickhoefer et al., 1999). Toutefois sa fonction à ce niveau demeure inconnue.

3. Tankyrase-1 :

La PARP la plus impliquée et la mieux étudiée dans la mitose est la Tankyrase-1. Les paragraphes suivants ont pour but de présenter de façon détaillée la fonction mitotique de la Tankyrase-1 et son partenaire NuMA.

4. Tankyrase-2 :

La Tankyrase-2 est localisée au niveau des pôles du fuseau mitotique et colocalise avec NuMA. Toutefois, elle semble incapable de l'hétéromodifier car en absence de la Tankyrase-1 NuMA n'est pas ADP-ribosylé. Sa fonction au cours de la mitose n'est pas encore connue (Hsiao and Smith, 2008).

B. Role de la Tankyrase-1 dans la mitose à travers la régulation du facteur mitotique NuMA :

Comme nous l'avons vu, la Tankyrase-1 est décrite comme l'enzyme principale responsable de la synthèse d'ADP-ribose au niveau du fuseau mitotique (Chang P et al., 2005).

La Tankyrase-1 a un rôle prépondérant dans la progression mitotique via son interaction avec la protéine NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus protein) (**figure 19**). Ces 2 protéines sont indissociables d'un point de vue fonctionnel au cours de la mitose.

NuMA est une protéine de haut poids moléculaire (238 kDa), nucléaire en interphase et recrutée aux pôles du fuseau mitotique durant la mitose, tout comme la Tankyrase-1. (Compton et al., 1992 ; Gaglio et al., 1995). Le recrutement de NuMA à ces pôles se ferait par son interaction avec son partenaire la dynéine qui, en tant que moteur protéique, permettrait le déplacement de NuMA le long des microtubules de leur extrémité + à leur extrémité – qui est située aux pôles du fuseau mitotique (Merdes et al., 1996). Le rôle de NuMA au cours de la division cellulaire est assez clair : cette protéine peut être poly(ADP-ribosyl)ée par la Tankyrase-1 au cours de la mitose (Chang W et al., 2005), permettant d'organiser les molécules NuMA en les maintenant les unes aux autres via le PAR que NuMA est capable de lier au niveau de son domaine Coiled-coil. Il en résulte la formation d'une structure semblable à une matrice au niveau du pôle de fuseau permettant une orientation correcte des faisceaux de microtubules (Chang P et al., 2009) (**figure 20**).

La présence de NuMA est nécessaire à l'établissement d'un fuseau mitotique pleinement fonctionnel. En effet, l'absence de NuMA a pour conséquence une déstructuration du fuseau mitotique aboutissant à des ralentissements de la mitose voire à des catastrophes mitotiques (Silk et al., 2009 ; Haren et al., 2009).

L'absence de la Tankyrase-1 n'empêche pas le recrutement de NuMA aux pôles du fuseau mitotique (Chang W et al., 2005) mais aura pour conséquence un blocage en pré-anaphase et une perte de la bipolarité du fuseau mitotique (Chang P et al., 2005).

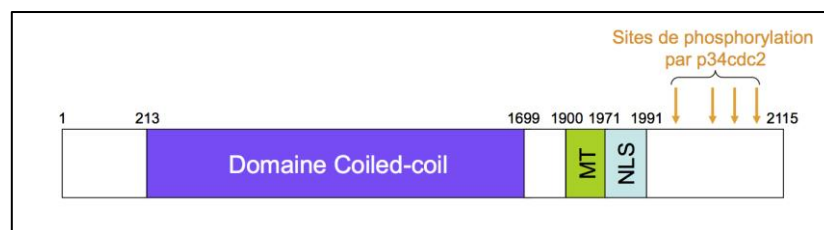


Figure 19 : Structure modulaire de NuMA :

MT : Microtubule-binding domain ; NLS : Nuclear Localization Signal

Les sites consensus de phosphorylation de NuMA par p34cdc2 (protéine 34 Cell Division Control 2) sont les suivants : thréonine 2000, 2040, 2091 et sérine 2072. La phosphorylation de NuMA est nécessaire à son recrutement aux pôles du fuseau mitotique car régulant son interaction avec la dynéine, moteur protéique le transportant le long des microtubules.

NuMA dispose de 6 motifs de liaison à l'ADN S/TPXX dans son extrémité N-terminale et de 7 entre les domaines Coiled-coil et MT.

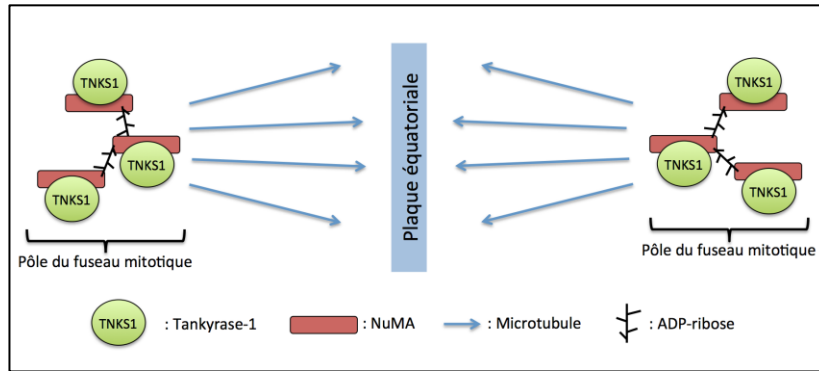


Figure 20 : Modèle d'interaction entre la Tankyrase-1 et NuMA au cours de la mitose :

Le PAR synthétisé par la Tankyrase-1 permet l'organisation des molécules NuMA aux pôles du fuseau mitotique. Ces dernières permettent une orientation correcte des faisceaux de microtubules formant le fuseau mitotique.

Concernant la localisation nucléaire en interphase de NuMA, aucune étude n'a pu démontrer précisément son rôle. Toutefois, plusieurs résultats semblent permettre de dessiner une ébauche de fonction.

En effet, NuMA est capable de se lier, via ses motifs S/TPXX, aux régions de l'ADN fixées à la matrice nucléaire appelées MARs pour Matrix Attachment Regions (Ludérus et al., 1994). Cette fixation allouerait peut être un rôle de NuMA dans l'organisation du génome. En outre, le large domaine Coiled-coil de NuMA pourrait suggérer une disposition de cette protéine en longs filaments durant l'interphase, d'autant que NuMA peut se dimériser grâce à son extrémité C-terminal et former alors de grandes structures oligomériques (Harborth et al., 1999) (**figure 21**).

De tels résultats pourraient suggérer que NuMA agit tel une charpente nucléaire durant l'interphase, à même d'aider à l'organisation du génome.

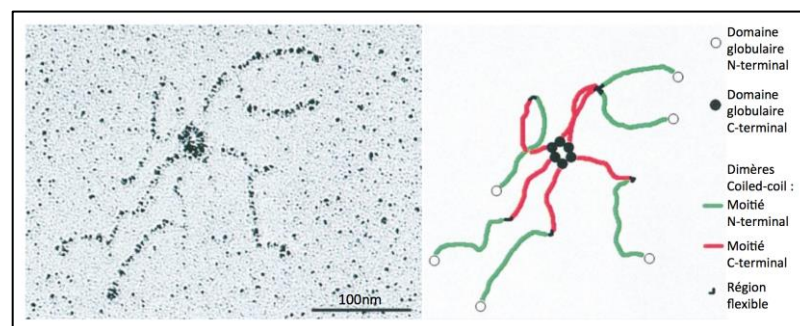


Figure 21 : Structure oligomérique de NuMA : D'après (Harborth et al., 1999).

A gauche, image représentative en microscopie électronique d'un oligomère à 6 « bras ».

A droite, représentation schématique de ce même oligomère.

V. Objectifs et cheminement du projet de recherche

Comme énoncé précédemment, PARP-3 était très peu caractérisée jusqu'alors et peu étudiée, dans l'ombre de son illustre « grande sœur » la PARP-1 et même de PARP-2. En dehors du fait qu'il est toujours intéressant et stimulant de s'engager dans un domaine scientifique peu visité, PARP-3 semblait être un bon choix d'étude car prometteur au vu de ses interactions avec de nombreuses protéines/enzymes impliquées dans diverses voies cellulaires.

En sachant que PARP-3 interagissait avec plusieurs protéines de réparation (PARP-1, XRCC1, etc...), nous nous sommes dans un premier temps demandés si elle était susceptible de jouer un rôle dans ce processus. Si d'aventures c'était le cas, il restait à déterminer quel mécanisme était mis en jeu. Pour répondre à cette question, nous avons opté pour l'utilisation de deux modèles d'études complémentaires : un modèle cellulaire humain déplété en PARP-3 de manière stable par un système d'interférence ARN, et un modèle murin rendu déficient en *Parp-3* par invalidation du gène *parp3* selon la méthode CRE/Lox.

Ces deux modèles ont pour avantage de broser un large spectre de recherche en permettant d'analyser un modèle humain disposant donc des deux isoformes de PARP-3 d'une part, et un modèle murin ne disposant donc que de l'isoforme courte de PARP-3 d'autre part.

Les résultats obtenus ont identifié PARP-3 comme un nouvel acteur de la réparation de l'ADN, qui intervient spécifiquement dans le mécanisme de réparation des cassures double-brin, et absolument pas dans la réparation des cassures simple-brin de l'ADN (voir Chapitre I).

En parallèle, nous avons entrepris la recherche de nouveaux partenaires protéiques de PARP-3 par spectrométrie de masse, et les résultats obtenus nous ont orientés vers un axe de recherche que nous ne soupçonnions alors pas, à savoir celui portant sur la division cellulaire. Nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un complexe protéique formé de PARP-3, de la Tankyrase-1 et de la protéine mitotique NuMA. PARP-3 y joue un rôle clé en régulant l'activité enzymatique de la Tankyrase-1 et ainsi le degré de poly(ADP-ribosyl)ation de NuMA par cette dernière. En outre ce complexe est apparu comme essentiel dans la maintenance de l'intégrité du fuseau mitotique et dans l'intégrité structurale des télomères (voir Chapitre II).

Voyant que PARP-3 s'avérait impliquée dans pas moins de deux mécanismes fondamentaux de la survie cellulaire, la surveillance de l'intégrité du génome et la division cellulaire, nous nous sommes alors demandés si cette enzyme ne pouvait pas être une potentielle cible thérapeutique dans la lutte contre le cancer. Nous avons pu obtenir des résultats prometteurs sur des lignées de cancer du sein humain déficientes en BRCA1 voire en Recombinaison Homologue (voir Chapitre III).

CHAPITRE I

PARP-3, un nouvel acteur de la réparation de l'ADN

1. Introduction :

De nombreuses études ont mis en lumière l'importance des rôles tenus par PARP-1 et PARP-2 dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Ces enzymes sont de loin les membres de la famille PARP les mieux caractérisés à l'heure actuelle. Peu d'éléments étaient connus sur PARP-3 lorsque nous avons entamé nos recherches.

Notre approche de caractérisation se voulait dans un premier temps fondamentale. En effet, nous voulions tenter de dégager une réelle fonction cellulaire de cette enzyme. Il avait été montré que PARP-3 pouvait former un hétérodimère avec PARP-1 et que PARP-3 comptait un grand nombre d'autres partenaires impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN.

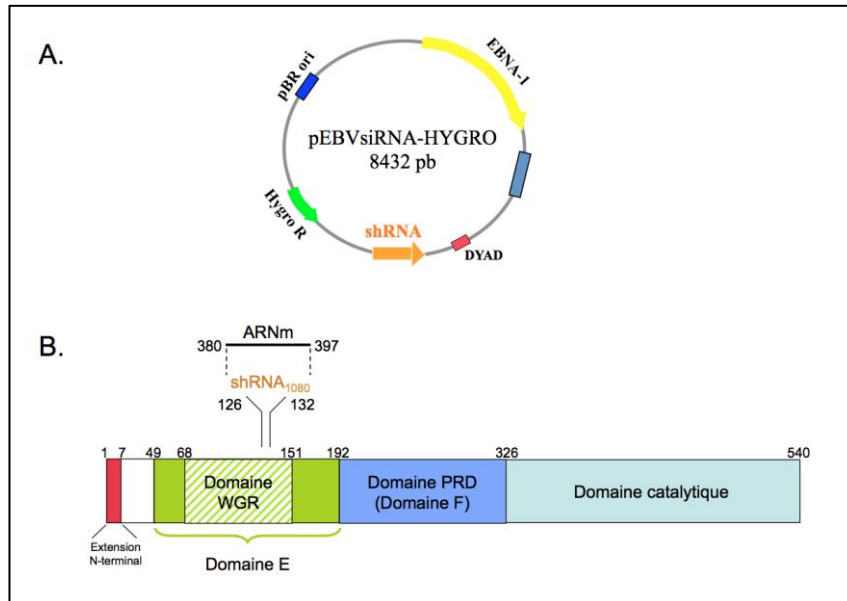
En vue d'avoir le champ d'investigation le plus large possible nous avons utilisé différents modèles d'étude :

- un modèle cellulaire : nous avons utilisé une lignée cellulaire de fibroblastes embryonnaires de poumon humain, la lignée MRC5 dans laquelle l'expression endogène de PARP-3 est significative. Nous l'avons transfectée de manière stable avec un vecteur plasmidique épisomal codant pour un ARN interférent (shRNA) reconnaissant les nucléotides 380 à 397 de l'ARNm codant pour PARP-3 (**figure 22**). Ce shRNA cible donc indistinctement les 2 isoformes de PARP-3. La lignée cellulaire ainsi obtenue est appelée PARP-3^{kd}.

- un modèle animal : les souris *Parp-3*^{-/-} ont été générées par la méthode Cre/loxP, consistant à croiser une souris exprimant la CreRecombinase sous un promoteur ubiquitaire avec une souris portant le gène de la *Parp-3* dont les exons 3-5 sont flanqués des sites de recombinaison loxP. Les souris hétérozygotes pour le gène *parp3* ainsi obtenues sont ensuite croisées entre

elles afin d'obtenir *in fine* des souris *Parp-3^{-/-}*. La lignée *Parp-3* floxée a été générée à l'Institut Clinique de la Souris, Illkirch.

Ces 2 modèles sont complémentaires, mais distincts. En effet, il nous faut garder à l'esprit que le modèle cellulaire humain est tributaire des 2 isoformes de PARP-3, alors que le modèle murin ne possède que la forme courte de PARP-3. Une différence de phénotype était donc possible.



Publication n°1 :

Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression

Christian Boehler, Laurent R. Gauthier, Oliver Mortusewicz, Denis S. Biard, Jean-Michel Saliou, Anne Bresson, Sarah Sanglier-Cianferani, Susan Smith, Valérie Schreiber, François Boussin, and Françoise Dantzer.

L'article paru dans PNAS présente les résultats résumés ci-après dans les paragraphes 2.1 et 2.2. Des résultats complémentaires à l'article sont également présentés.

2. Résultats :

2.1. PARP-3 est impliquée dans les mécanismes de réparation des DSB :

PARP-3 a de nombreux partenaires protéiques impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Nous avons donc voulu déterminer si PARP-3 était également impliquée dans ces processus.

Par une approche par microirradiation laser nous avons pu mettre en évidence un recrutement de PARP-3 au niveau des sites de dommages de l'ADN.

Après exposition à des rayons X, nous avons observé une persistance des foyers γ H2AX, marqueur des DSB, dans les cellules PARP-3^{kd} par rapport aux cellules contrôle, indiquant un retard dans le mécanisme de réparation des cassures de l'ADN.

En outre, nous avons également observé un nombre accru de cellules présentant des foyers γ H2AX en absence de traitement dans la population de cellules PARP-3^{kd}, signe d'une instabilité génomique spontanée en absence de PARP-3.

Afin d'analyser la capacité de réparation des cellules PARP-3^{kd}, nous avons réalisé des essais COMET en conditions alcalines (permettant de voir la cinétique de réparation des SSB) et en conditions neutres (permettant de voir la cinétique de réparation des DSB). Alors que la cinétique de réparation des SSB n'est pas altérée en absence de PARP-3 (**figure 23**), nous avons observé un retard dans la cinétique de réparation des DSB dans les cellules PARP-3^{kd} par rapport aux lignées contrôle. Ces résultats indiquent que PARP-3 est impliquée spécifiquement dans les mécanismes de réparation des DSB.

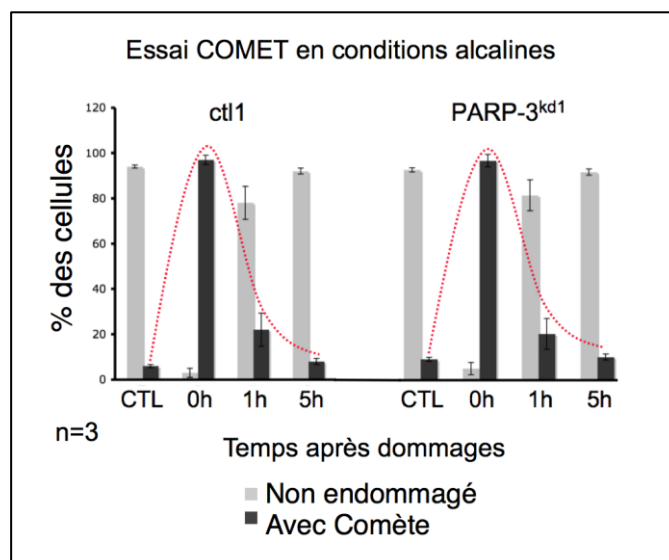


Figure 23 : L'absence de PARP-3 n'a aucun impact sur la cinétique de réparation des SSB :

Essai COMET effectué en condition alcaline. L'histogramme montre les pourcentages de cellules non réparées (Avec Comète) et de cellules réparées (Non endommagé) dans les populations contrôle (ctl1) ou déplétée en PARP-3 (PARP-3^{kd1}) après irradiation aux rayons X de 10Gy. Une moyenne de 50 cellules a été comptée par point. Les expériences ont été réalisées 3 fois, donnant des résultats similaires.

Cette figure vient en complément de la figure 1.C de l'article paru dans PNAS.

2.2. PARP-3 agit en synergie avec PARP-1 dans la réponse cellulaire aux dommages induits par des radiations ionisantes :

De façon surprenante, nous avons montré que la déplétion de PARP-3 n'a pas d'impact sur la survie cellulaire à long terme après exposition à des rayons X. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'absence de PARP-3 pouvait être compensée par l'action d'une autre PARP capable d'intervenir dans la réparation de l'ADN, soit PARP-1 et/ou PARP-2.

En effet, l'inhibition de PARP-1 et 2 dans les cellules PARP-3^{kd} augmente leur sensibilité aux radiations ionisantes par rapport aux cellules contrôle.

Nous avons également étudié la sensibilité aux radiations ionisantes de notre modèle murin, comprenant des souris déficientes pour Parp-3, pour Parp-1 ou pour les 2 gènes. Les souris sauvages et Parp-3^{-/-} ne sont pas sensibles au traitement. Les souris Parp-1^{-/-} présentent une sensibilité aux radiations ionisantes, phénotype déjà observé par Ménissier de Murcia et al (Ménissier de Murcia et al., 2003). Cette sensibilité est encore augmentée pour les souris déficientes à la fois pour Parp-1 et Parp-3.

Ces résultats indiquent donc que PARP-1 pourrait être capable de suppléer PARP-3 en son absence dans la réponse cellulaire aux dommages induits par des radiations ionisantes. Nous en déduisons une possible synergie de PARP-1 et 3 dans la maintenance de l'intégrité du génome.

A la suite de ces travaux, nos objectifs ont consisté à déterminer le rôle de PARP-3 dans la réponse aux DSB et à décortiquer les mécanismes moléculaires mis en jeu.

2.3. L'absence de PARP-3 sensibilise les cellules humaines aux agents générant des DSB :

Dans le but d'évaluer l'impact de l'absence de PARP-3 dans la réponse cellulaire aux DSB, nous avons exposé les lignées contrôle et PARP-3^{kd} à des agents générant spécifiquement ou essentiellement des DSB tels que respectivement l'inhibiteur de Topoisomérase II Etoposide et le radiomimétique Bléomycine, puis nous avons réalisé des tests de survie par clonogénicité. Alors que les cellules PARP-3^{kd} ne sont pas radiosensibles (Boehler et al., 2011), leur survie est dramatiquement diminuée après traitement à l'Etoposide ou la Bléomycine avec dans les deux cas des baisses de survie de l'ordre de 60%.

De plus, ce taux de survie est encore diminué après l'addition d'un traitement inhibiteur de PARP-1 et 2 (**figure 24**). Cet effet additif de l'inhibiteur PARP semble plus important après un traitement à la Bléomycine qu'après un traitement à l'Etoposide. Ceci s'explique par le fait que l'Etoposide ne génère que des DSB, alors que la Bléomycine est un radiomimétique générant essentiellement des DSB mais également des SSB dont la réparation fait intervenir PARP-1 et 2.

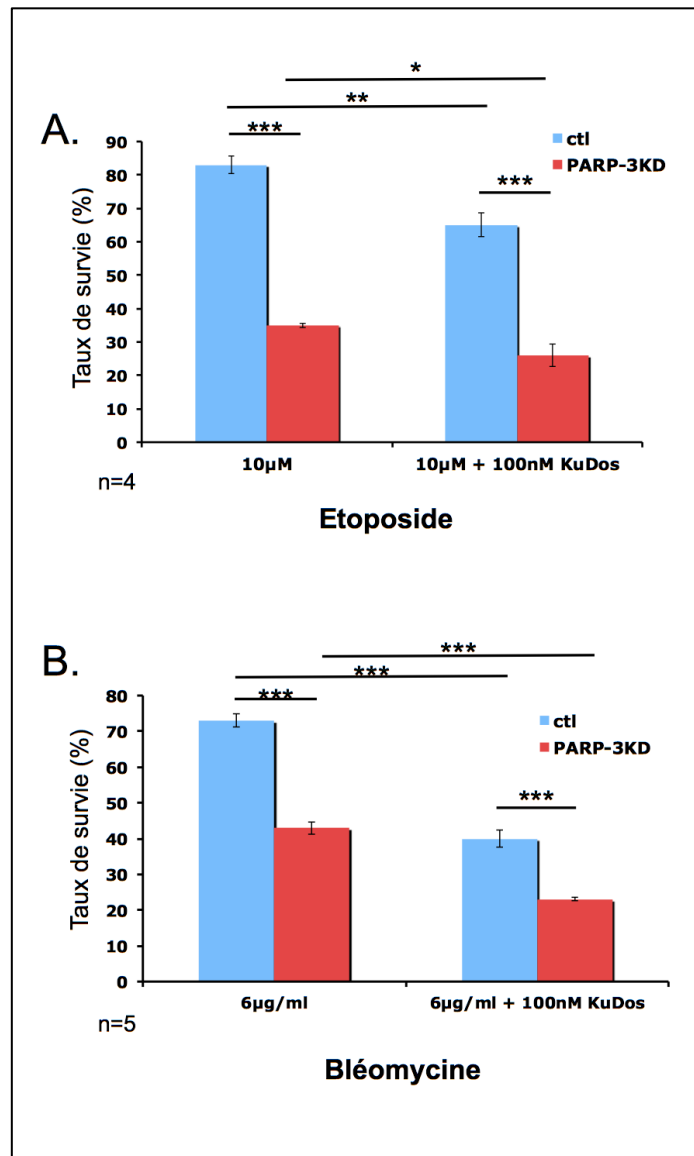


Figure 24 : L'absence de PARP-3 induit une diminution du taux de survie après exposition à des agents générateurs de DSB :

A. Test de clonogénicité des cellules contrôle (ctl) et PARP-3^{kd} après un traitement d'une heure à l'Etoposide (10µM) avec ou sans traitement préalable d'une heure avec l'inhibiteur PARP Ku-0058948. Les expériences ont été réalisées 4 fois, donnant des résultats similaires. **B.** Test de clonogénicité des cellules contrôle (ctl) et PARP-3^{kd} après un traitement d'une heure à la Bléomycine (6µg/ml) avec ou sans traitement préalable d'une heure avec l'inhibiteur PARP Ku-0058948. Les expériences ont été réalisées 5 fois, donnant des résultats similaires.

* P<0,05 ; ** P<0,01 ; *** P<0,001

Ces résultats indiquent un rôle spécifique de PARP-3 dans la réponse cellulaire aux DSB. Ces cassures peuvent être réparées par les mécanismes de réparation du NHEJ Classique, du NHEJ Alternatif ou du HR. Or il a été montré que PARP-3 interagit avec des acteurs des NHEJ Classique et Alternatif (Rouleau et al., 2007 ; Rulten et al., 2011). Nous avons donc

dans un premier temps voulu vérifier si PARP-3 était bien impliquée dans le mécanisme du NHEJ.

2.4. L'efficacité du NHEJ *in vitro* est diminuée en absence de Parp-3 :

Dans le but d'explorer le rôle de PARP-3 dans le NHEJ, nous avons réalisé des extraits nucléaires de splénocytes issus de souris Parp-3^{+/+} (WT : Wild Type) et Parp-3^{-/-} (Parp-3 KO) et nous avons analysé leur capacité de réparation d'un plasmide linéarisé selon le système de réparation par NHEJ *in vitro* développé par Iliakis et al. (Iliakis et al., 2006). Le plasmide a été linéarisé soit par une enzyme de restriction générant des extrémités cohésives (EcoR1) soit par une enzyme de restriction générant des extrémités franches (Sma1). La capacité de ligation des extrémités est évaluée par la formation de dimères et multimères sur gel d'agarose. La **figure 25** montre une diminution significative de la production de produits de réaction par les extraits Parp-3^{-/-} par rapport aux extraits Parp-3^{+/+} indiquant une diminution de la capacité de ligation des plasmides et reflétant une altération du NHEJ.

La formation de multimères est également dépendante de Ku (Nick McElhinny et al., 2005), suggérant que ce test d'activité de ligation *in vitro* permettrait essentiellement de mesurer l'efficacité du NHEJ Classique. Nos résultats indiqueraient alors un rôle de PARP-3 dans cette sous-voie en accord avec les travaux de Rulten et al. décrivant PARP-3 comme un activateur de l'étape de ligation dépendante de XRCC4/ADN Ligase IV (Rulten et al., 2011).

Toutefois des tentatives de complémentation par l'addition de PARP-3 humaine purifiée dans les extraits Parp-3^{-/-} n'ont pas permis d'augmenter leur capacité de ligation. Ceci peut s'expliquer par l'absence d'une modification post-traductionnelle spécifique de la forme purifiée et nécessaire à son activité dans ce processus, ou par un problème de quantité optimale de PARP-3 à ajouter au mélange *in vitro*. En effet, une quantité trop importante de PARP-3 pourrait donner lieu à un encombrement stérique, tandis qu'une quantité trop faible pourrait être limitante, ou l'augmentation du taux de réparation est si faible dans ces conditions qu'elle est indétectable.

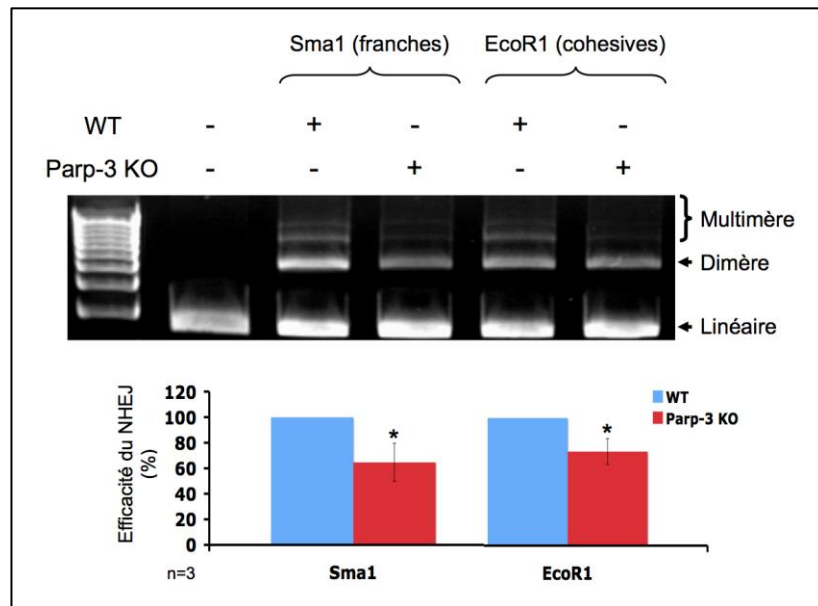


Figure 25 : L'efficacité du NHEJ est réduite *in vitro* en absence de Parp-3 :

En haut, profil de ligation du plasmide linéarisé avec Sma1 (générant des extrémités franches) ou avec EcoR1 (générant des extrémités cohésives) sur gel d'agarose pour les différents extraits nucléaires.

En bas, graphique de quantification de l'efficacité du NHEJ dans les différentes conditions. Les expériences ont été réalisées 3 fois, donnant des résultats similaires. * P<0,05

2.5. PARP-3 : un acteur des NHEJ Classique ET Alternatif ?

PARP-3 interagit avec des protéines du NHEJ Classique mais aussi Alternatif, suggérant un rôle de PARP-3 dans l'une et/ou l'autre voie. Dans le but d'évoluer dans cette question, dans un premier temps nous avons comparé la survie des cellules contrôle et PARP-3^{kd} traitées à l'Etoposide après inhibition de DNA-PK, une protéine clé du NHEJ Classique, par la Wortmannin.

Nous avons exposé les lignées contrôle ou PARP-3^{kd} à un traitement à la Wortmannin 20μM et/ou un traitement à l'Etoposide 10μM (**figure 26**). L'exposition à l'Etoposide diminue la survie des cellules PARP-3^{kd} de 50% par rapport aux cellules contrôle. Le traitement des cellules à la Wortmannin seul n'a aucun effet sur la survie cellulaire des deux lignées, mais diminue drastiquement le taux de survie des cellules contrôles traitées à l'Etoposide. De manière significative, ce traitement éradique presque complètement les cellules PARP-3^{kd} révélant un effet additif de la déplétion de PARP-3 et de l'inhibition de la DNA-PK. Si l'on considère DNA-PK comme un acteur clé du NHEJ Classique, ce résultat

pourrait révéler une contribution de PARP-3 dans la voie alternative du NHEJ lorsque la voie classique est altérée.

Toutefois, il est à noter que la Wortmannin n'est pas un inhibiteur spécifique de DNA-PK mais inhibe d'autres protéines de la famille PI3kinases dont les protéines ATM et ATR. L'effet additif du double traitement Etoposide-Wortmannin peut donc révéler une contribution de l'inhibition de ces autres enzymes.

De plus, il a été montré que DNA-PK est capable de phosphoryler RPA en réponse aux dommages dans l'ADN (Zernik-Kobak et al., 1997 ; Shao et al., 1999). Cette phosphorylation semble importante pour signaler la présence de cassures lors du passage de la fourche de réplication, activer le point de contrôle en phase S du cycle cellulaire et stimuler le processus de réparation de ces cassures par le HR. Il n'est donc pas à exclure qu'en inhibant l'activité de DNA-PK, on perturbe également cette voie de réparation, expliquant l'effet cumulatif observé sur la survie cellulaire après déplétion de PARP-3.

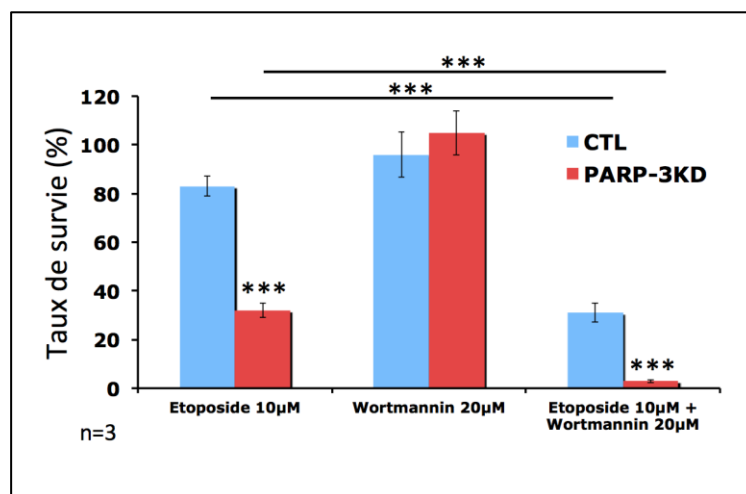


Figure 26 : Un traitement à la Wortmannin et la déplétion conjointe de PARP-3 induisent une sensibilité cellulaire exacerbée aux DSB :

Test de clonogénicité des lignées MRC5 contrôle (ctl) et PARP-3^{kd} après traitement d'une heure à l'Etoposide (10µM) et/ou traitement continu à la Wortmannin (20µM). Les expériences ont été réalisées 3 fois, donnant des résultats similaires. *** P<0,001

Dans un second temps, nous avons également évalué l'impact d'une déplétion de XRCC1, acteur du NHEJ Alternatif, dans nos lignées, par des tests de survie par clonogénicité.

La déplétion de XRCC1 n'induit pas une importante diminution du taux de survie spontanée, dans les lignées PARP-3^{kd} par rapport aux lignées contrôle. Le traitement des cellules par

l'Etoposide diminue le taux de survie des lignées PARP-3^{kd} et des cellules déplétées en XRCC1, mais cette toxicité n'est pas augmentée dans les cellules déplétées à la fois en PARP-3 et en XRCC1 (**figure 27**). Il n'y a donc pas d'effet cumulatif de la double déplétion, ce qui indique que ces deux protéines pourraient faire partie de la même voie de réparation des DSB, à savoir le NHEJ Alternatif.

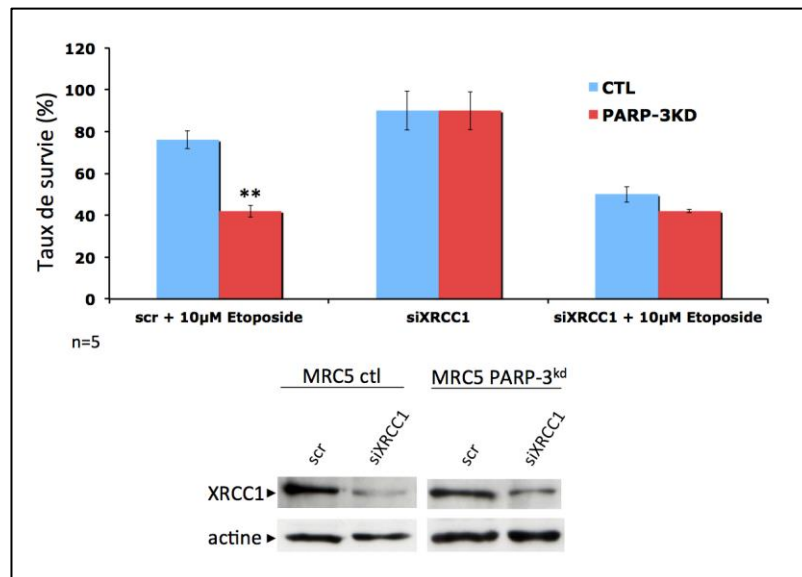


Figure 27 : La déplétion conjointe de PARP-3 et XRCC1 n'induit pas une sensibilité cellulaire exacerbée aux DSB :

En haut, test de clonogénicité des lignées MRC5 contrôle (ctl) et PARP-3^{kd} transfectées transitoirement avec un siRNA contrôle (scr) ou dirigé contre l'ARNm de XRCC1 (siXRCC1) suivi ou non d'un traitement d'une heure à l'Etoposide (10µM).

En bas, Western Blot montrant les déplétions transitoires de XRCC1 dans les cellules contrôle (ctl) et PARP-3^{kd}. Les expériences ont été réalisées 5 fois, donnant des résultats similaires. ** P<0,01

2.6. La déplétion conjointe de PARP-3 et RAD51 induit une sensibilité accrue des cellules MRC5 aux DSB induites par l'Etoposide :

PARP-3 apparaît comme actrice du NEHJ, mais ne compte aucun partenaire protéique impliqué dans le HR. Pour vérifier si PARP-3 est également actrice du HR, nous avons réalisé dans nos lignées une déplétion de RAD51, acteur du HR, puis nous avons procédé à des tests de survie par clonogénicité.

La déplétion seule de RAD51 induit une importante diminution du taux de survie dans les lignées contrôle et PARP-3^{kd}, mais cet effet est légèrement plus important pour les cellules

PARP-3^{kd}, indiquant un effet toxique cumulatif de la double déplétion PARP-3/RAD51. Ce profil est accentué après exposition à l'Etoposide (**figure 28**). Ces résultats révèlent donc une toxicité augmentée de la double déplétion d'une protéine du HR et de PARP-3.

Toutefois, la forte toxicité de la déplétion de RAD51 dans ces lignées peut biaiser les résultats obtenus, et il sera nécessaire de confirmer ces analyses par la déplétion d'une autre protéine actrice du HR.

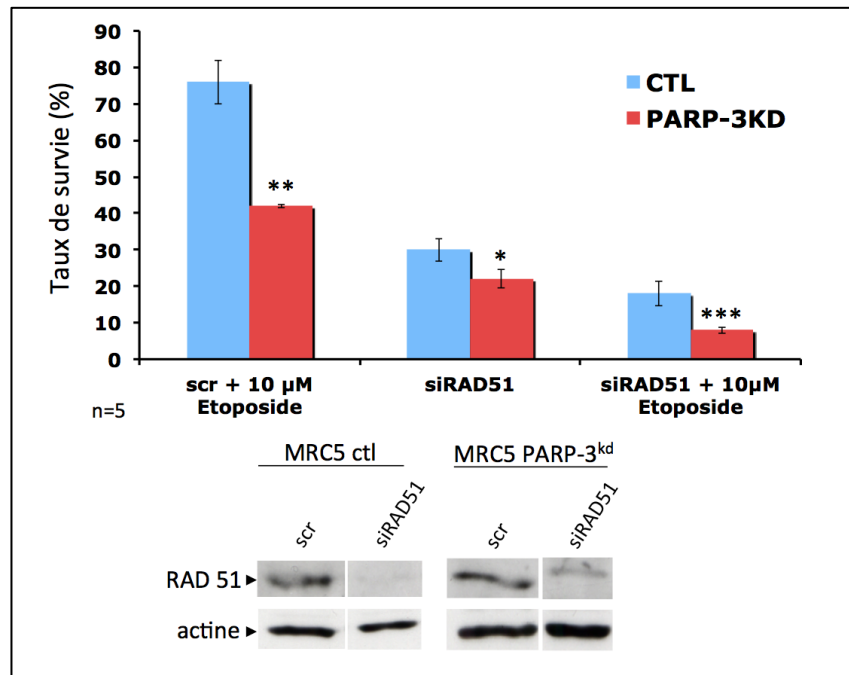


Figure 28 : La déplétion conjointe de PARP-3 et RAD51 induit une sensibilité cellulaire exacerbée aux DSB induites par l'Etoposide :

En haut, test de survie par clonogénicité des lignées MRC5 contrôle (ctl) et PARP-3^{kd} transfectées transitoirement avec un siRNA contrôle (scr) ou dirigé contre l'ARNm de RAD51 (siRAD51) suivi ou non d'un traitement d'une heure à l'Etoposide (10μM).

En bas, Western Blot montrant les déplétions transitoires de RAD51 dans les cellules contrôle (ctl) et PARP-3^{kd}. Les expériences ont été réalisées 5 fois, donnant des résultats similaires. * P<0,05 ; ** P<0,01 ; *** P<0,001

2.7. La déplétion de PARP-3 accélère la phosphorylation de RPA et le recrutement de RAD54 en réponse à l'Etoposide :

Des études préalables ont identifié l'Etoposide comme un inducteur de la phosphorylation de RPA (Shao et al., 1999). Nous avons donc analysé la cinétique de phosphorylation de RPA dans les cellules PARP-3^{kd} par rapport aux cellules contrôle. Nos

résultats révèlent une phosphorylation de RPA plus précoce dans les cellules PARP-3^{kd} (dès 3h après traitement) que dans les cellules contrôle (5h après traitement) (**figure 29**). La phosphorylation de RPA peut être catalysée par DNA-PK, ATM ou ATR. Nous avons vérifié l'activation de DNA-PK en suivant son autophosphorylation dans les mêmes conditions expérimentales ; cette autophosphorylation est identique dans les cellules PARP-3^{kd} et dans les cellules contrôle, suggérant que l'activation de DNA-PK n'est pas altérée.

De plus, l'Etoposide peut induire un blocage de la fourche de réplication, un stress réplcatif. Ce processus induit la phosphorylation et l'activation de la kinase du point de contrôle Chk1 médiée par ATR. Nous avons comparé l'induction de cette phosphorylation dans nos deux lignées. Nous n'avons pas identifié de différence significative dans l'activation de Chk1.

La phosphorylation de RPA induite par les cassures DSB est également critique pour l'étape de résection lors du processus du RH et le chargement des protéines RAD51 et RAD54.

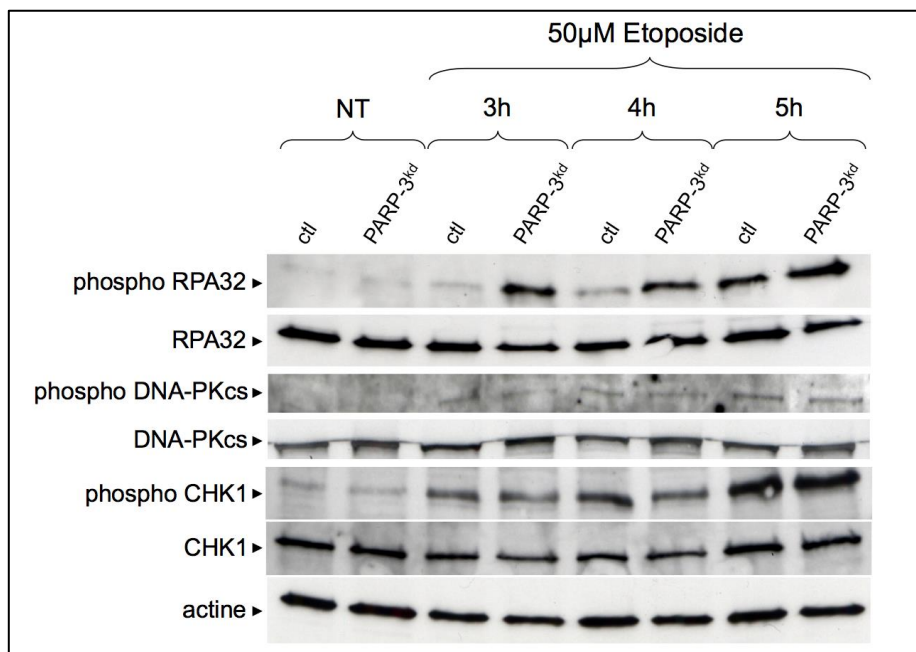


Figure 29 : La phosphorylation de RPA induite par l'Etoposide se fait plus précocement dans les cellules PARP-3^{kd} :

NT : condition contrôle où les cellules sont Non Traitées ; ctl : lignée MRC5 contrôle ; PARP-3^{kd} : lignée MRC5 déplétée en PARP-3

Dans le but de comprendre le rôle de la phosphorylation précoce de RPA, nous avons également analysé la cinétique de formation de foyers RAD54 en réponse à l'Etoposide par immunofluorescence. Le pourcentage de cellules présentant des foyers RAD54 est augmenté spontanément dans les cellules PARP-3^{kd} par rapport aux cellules contrôle. Après Etoposide, ce pourcentage augmente plus rapidement dans les cellules PARP-3^{kd} que dans les lignées contrôle (**figure 30**).

L'ensemble de ces résultats suggère donc une activation plus rapide du HR dans les cellules PARP-3^{kd} par rapport aux cellules contrôle.

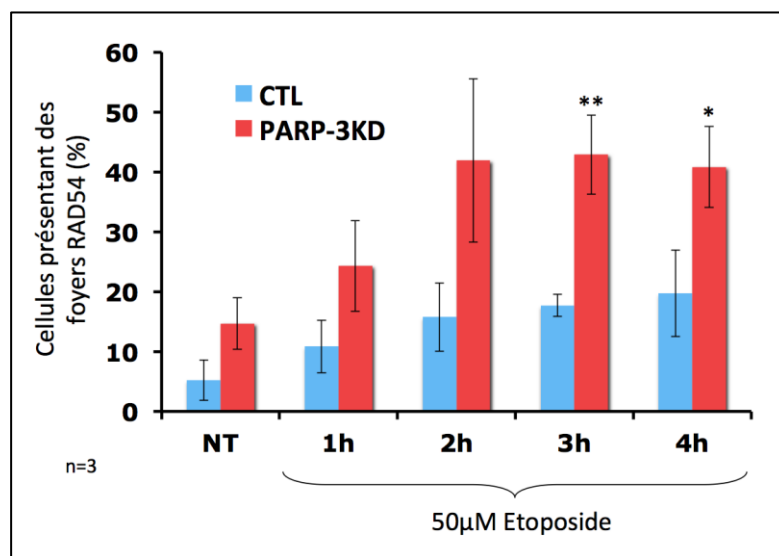


Figure 30 : Le nombre de cellules présentant des foyers RAD54 augmente plus rapidement en absence de PARP-3 en réponse à l'Etoposide :

Les cellules sont traitées avec de l'Etoposide 50µM pendant les temps indiqués puis fixées avant marquage et comptage des foyers RAD54. NT : cellules Non Traitées. ctl : lignée MRC5 contrôle ; PARP-3^{kd} : lignée MRC5 déplétée en PARP-3. Les expériences ont été réalisées 3 fois, donnant des résultats similaires.

* P<0,05 ; ** P<0,01

3. Discussion et perspectives :

3.1. PARP-3, un nouvel acteur de la réparation des DSB par le NHEJ :

L'ensemble de nos résultats actuels introduit PARP-3 comme un élément important du mécanisme du NHEJ. Nos résultats de clonogénicité et l'identification des partenaires

protéiques de PARP-3 impliqués à la fois dans les NHEJ Classique et Alternatif suggèrent même que cette enzyme pourrait avoir un rôle dans ces deux mécanismes de réparation.

D'une part, PARP-3 interagit avec les protéines DNA-PKcs, Ku70 et Ku80, actrices du NHEJ Classique (Rouleau et al., 2007). Les travaux de Rulten et al. ont identifié une interaction fonctionnelle avec l'ADN Ligase IV, protéine clé de la voie classique du NHEJ. Nos résultats de ligation par NHEJ *in vitro* sont en accord avec ces travaux.

D'autre part, nous avons pu mettre en évidence une synergie entre PARP-1 et 3 dans la réponse cellulaire aux radiations ionisantes. De manière intéressante les travaux de Loseva et al. indiquent que PARP-3 peut stimuler l'activité de PARP-1. Cette dernière est également actrice du NHEJ Alternatif. De plus, il a été montré que l'histone H1 intervient dans cette même voie du NHEJ et que sa présence stimule l'activité de PARP-1 (Rosidi et al., 2008). Or cet histone est également substrat de PARP-3. Au vu de ces différents résultats, une interconnection de ces 3 protéines pourrait donc être envisagée, et plus particulièrement au cours du mécanisme du NHEJ Alternatif.

En outre, nous n'avons pu détecter aucun effet cumulatif de l'absence de PARP-3 et de XRCC1, acteur du NHEJ Alternatif, sur la survie cellulaire après traitement à l'Etoposide. Ce résultat, ainsi que l'impact additif de l'inhibition de DNA-PK et de la déplétion de PARP-3, seraient également en accord avec un rôle de PARP-3 dans le NHEJ Alternatif.

Il est à noter qu'une étude récente a mis en évidence de façon intéressante l'existence dans *Dictyostelium discoideum* d'une troisième PARP (appelée Adprt1a) impliquée dans les mécanismes de réparation des DSB via le NHEJ (Couto et al., 2011).

Afin d'évoluer dans la caractérisation du rôle de PARP-3 dans le NHEJ, nous pourrions réaliser des tests de survie de la lignée PARP-3^{kd} après déplétion des autres acteurs du NHEJ Classique/NHEJ Alternatif/HR. Mais déterminer de cette façon dans quelle(s) voie(s) de réparation des DSB PARP-3 est impliquée n'est pas forcément simple. La principale difficulté d'une telle étude est que les voies de réparation de l'ADN ne sont visiblement pas des voies cloisonnées. En effet, des intervenants du NHEJ Alternatif sont impliqués dans les mécanismes de réparation des SSB, tandis que DNA-PK (formé de Ku70/80 et de DNA-PKcs), pourtant décrite comme actrice du NHEJ Classique, aurait visiblement un rôle dans la phosphorylation de RPA, acteur du HR (Wang et al., 2001 ; Cruet-Hennequart et al., 2006).

Il en est de même pour le complexe MRN, impliqués aussi bien dans le NHEJ Classique que dans le HR.

Au vu de ces exemples, il s'avère difficile de cibler une voie sans en atteindre une autre directement ou indirectement, ce qui complique forcément les analyses subséquentes.

Les tests de survie sont une première manière d'aborder cette question *in vivo*, mais d'autres approches expérimentales sont nécessaires pour confirmer les résultats.

Dans cette idée, nous allons effectuer des tests de réparation *in vivo*. En effet, des systèmes rapporteurs *in vivo* de l'activité du HR ont été développés (Laulier et al., 2011).

Ces systèmes consistent en des constructions plasmidiques présentant un gène codant pour la GFP dont le cadre de lecture est altéré par la présence d'un site de restriction unique de l'endonucléase *IsceI*. Après transfection du plasmide rapporteur d'activité et d'un plasmide codant pour l'enzyme de restriction *IsceI*, cette dernière induit une cassure unique dans le vecteur rapporteur. La réparation de cette cassure permet l'expression du marqueur GFP. La fluorescence mesurée indique le degré de réparation du plasmide par le mécanisme étudié.

Pour confirmer dans quelle(s) voie(s) de réparation des DSB PARP-3 se trouve impliquée, nous utiliserons aussi un système rapporteur de l'activité des NHEJ Classique et Alternatif développé dans le laboratoire de Lopez BS. Ce système consiste également en une construction plasmidique, mais différente car codante pour les antigènes membranaires H2Kd, CD4 et CD8. La séquence codante pour H2Kd est placée en amont des séquences codantes pour CD4 et CD8, empêchant leur expression.

Après transfection du plasmide rapporteur d'activité et d'un plasmide codant pour l'enzyme de restriction *IsceI*, cette dernière induit des DSB dans le vecteur rapporteur. La réparation de ces cassures permettra l'expression de la protéine membranaire CD4 ou CD8 (**figure 31**). Cette expression peut être analysée en cytométrie de flux, tandis que les produits de réparation peuvent être séquencés : ils sont en effet différents selon la voie du NHEJ utilisée. Le NHEJ Classique va utiliser les nucléotides protrustifs générés par *IsceI* au niveau de la cassure au cours de la réparation, soit de façon parfaite non génératrice d'erreur, soit de façon imparfaite aboutissant à l'insertion ou à la délétion de 1, 2 ou 3 nucléotides. Le NHEJ Alternatif est quant à lui générateur d'erreurs et supprimera au moins 4 nucléotides au cours de la réparation (Rass et al., 2009 ; Lemaître et al., 2012).

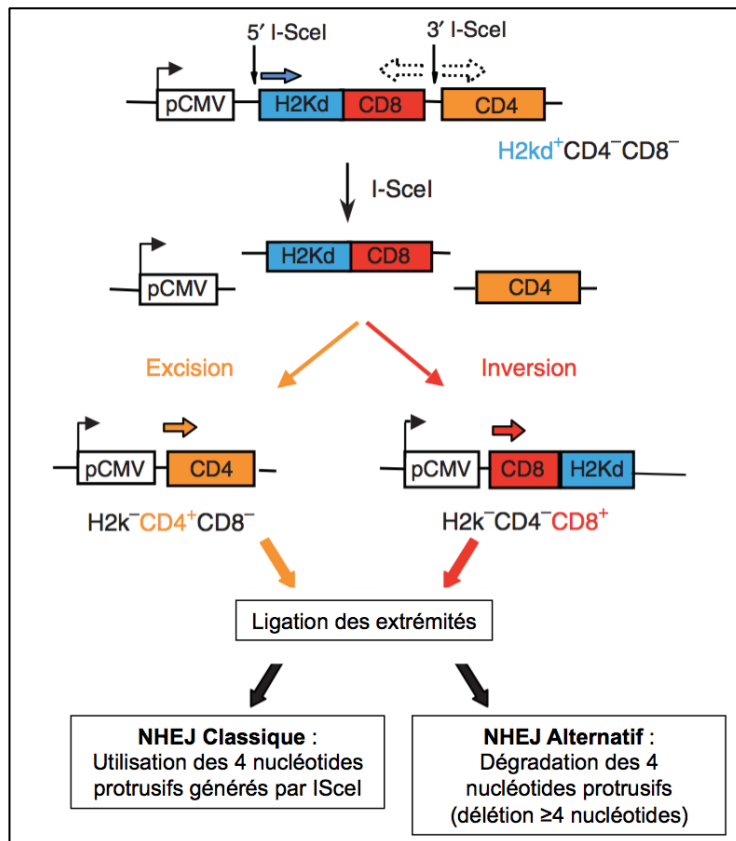


Figure 31 : Représentation schématique du système rapporteur d'activité du NHEJ *in vivo* : D'après (Rass et al., 2009).

La méganucléase I-SceI induit des cassures au niveau des sites de restriction indiqués. Les 2 voies du NHEJ prennent en charge la réparation de la cassure et réalisent soit une excision soit une inversion des séquences codantes. Une excision permet l'expression de CD4, une inversion permet l'expression de CD8. Les produits de réparation diffèrent selon la voie du NHEJ utilisée.

En outre, au vu de la nécessité de génération/réparation de DSB au cours des processus de recombinaison V(D)J, du CSR et de l'hypermutation somatique, il serait intéressant de vérifier si ces mécanismes ne sont pas altérés dans les organes lymphoïdes de souris *Parp-3^{-/-}*.

3.2. L'absence de PARP-3 induit-elle une activation de la réparation par le HR ?

La phosphorylation précoce de RPA dans les cellules déplétées en PARP-3 après traitement à l'Étoposide pourrait indiquer une hyper-activation du HR, mécanisme appelé Hyper Homologous Recombination (HHR). Ce phénomène a été observé dans le cas de

mutations du domaine BRCT de BRCA1 et semble lié à une altération de la résection de l'ADN, étape précoce du HR (Dever et al., 2011).

Le domaine BRCT interagit avec les phosphoprotéines Abraxas-RAP80 (Receptor-Associated Protein 80) et CtIP. Le complexe BRCA1-RAP80 a été décrit comme régulant la résection de l'ADN au cours du HR (Coleman and Greenberg, 2011 ; Hu et al., 2011) et le HHR est induit après déplétion d'Abraxas-RAP80. Au cours du HHR, RAD51 et RPA sont associés aux sites de dommage à un taux anormalement élevé et de façon persistante, suggérant une résection excessive de l'ADN. Inversement, la déplétion de BRCA1 ou de CtIP induit une diminution de l'activité du HR, suggérant que la présence de BRCA1 est nécessaire au HHR, ainsi que son interaction avec CtIP. Par analogie, il serait intéressant d'étudier l'impact de l'absence de PARP-3 sur l'étape de résection lors du HR.

Si PARP-3 est impliquée dans les mécanismes du NHEJ (Classique et Alternatif), il peut être envisagé que la cellule PARP-3^{kd} puisse tenter de réparer ses DSB par le HR. Cette voie de réparation serait donc déclenchée plus précocement et éventuellement hyper-activée pour pallier l'inefficacité du NHEJ.

Il demeure frappant que cette activation précoce du HR dit fidèle ne permette pas une réparation efficace des lésions et la survie cellulaire. Ce résultat rejoindrait la théorie selon laquelle le HHR est une activation anormale du HR ne permettant pas à la cellule de survivre si le NHEJ venait à échouer (Dever et al., 2012).

De plus, la phosphorylation de RPA est également associée au stress répliatif. Pour étudier le possible rôle de PARP-3 dans la réponse cellulaire au stress répliatif, nous avons débuté l'analyse des différentes phosphorylations de RPA en réponse à l'Etoposide, agent générateur de DSB au niveau de la fourche de répliation. Nos résultats actuels pourraient indiquer une activation précoce de la réponse au stress répliatif dans les cellules PARP-3^{kd} par rapport aux cellules contrôle.

4. Conclusion :

Nos études ont permis de mettre en évidence un rôle essentiel et spécifique de PARP-3 dans le mécanisme de réparation des DSB. PARP-3 pourrait intervenir dans les 2 voies de

réparation du NHEJ, Classique et Alternatif. Nous avons également pu observer une phosphorylation précoce de RPA et un recrutement précoce et augmenté de RAD54 en absence de PARP-3 après traitement à l'Etoposide, suggérant une activation accélérée du HR.

PARP-3 semble impliquée dans plusieurs systèmes de réparation de l'ADN. Il reste toutefois à vérifier ces résultats par une approche de réparation de DSB *in vivo* et à déterminer quel possible rôle PARP-3 peut jouer au cours de la réponse cellulaire au stress répliatif.

CHAPITRE II

PARP-3 et progression mitotique

1. Introduction :

En parallèle de nos études sur le rôle de PARP-3 dans la réponse cellulaire aux dommages dans l'ADN, nous avons engagé des recherches de nouveaux partenaires protéiques de PARP-3, ceci afin d'avoir une vue plus large des possibles implications de PARP-3 dans les mécanismes cellulaires. Un aspect pléiotropique de PARP-3 était possible connaissant l'existence des 2 isoformes qui sont de structure et de localisation subcellulaire différentes.

L'ensemble des résultats définissant le rôle de PARP-3 dans la progression mitotique figurent dans nos publications PNAS (Boehler et al., 2011) et Cell Cycle (Boehler and Dantzer, 2011). Ce chapitre en résume les principaux messages. Des résultats complémentaires sont également présentés dans un souci de précision.

2. Résultats :

2.1. PARP-3 forme un complexe avec NuMA et la Tankyrase-1 :

Après une immunoprécipitation réalisée dans les cellules COS-1 avec un anticorps anti-PARP-3, nous avons réalisé une analyse par spectrométrie de masse des partenaires copurifiés qui nous a permis d'identifier le facteur mitotique NuMA comme un nouveau partenaire protéique de PARP-3. Par des études complémentaires d'interactions protéiques, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un complexe multi-protéique formé de PARP-3, de la Tankyrase-1 et de NuMA.

2.2. PARP-3 a un rôle régulateur clé du complexe PARP-3/Tankyrase-1/NuMA :

Des études précédentes ont mis en évidence le fait que la Tankyrase-1 est capable de s'automodifier et d'hétéromodifier NuMA par poly(ADP-ribosyl)ation (Chang W et al., 2005). Il a également été montré que PARP-3 est activée par l'ADN fragmenté et est capable de s'automodifier (Augustin et al., 2003).

Par des études de poly(ADP-ribosyl)ation *in vitro*, nous avons pu établir un modèle fonctionnel du complexe protéique pour lequel se présentent 2 cas de figure :

- 1) en présence d'ADN : PARP-3 est capable d'ADP-ribosyler NuMA directement
- 2) en absence d'ADN : PARP-3 stimule l'automodification de la Tankyrase-1, ce qui stimule aussi son activité d'hétéromodification et par conséquent l'ADP-ribosylation de NuMA.

2.3. PARP-3 est impliquée dans la progression mitotique :

La Tankyrase-1 et NuMA sont des acteurs clé de la progression de la mitose. Pour vérifier si PARP-3 jouait également un rôle dans les processus mitotiques, nous avons transfecté nos lignées MRC5 contrôle et PARP-3^{kd} avec un plasmide codant pour une protéine de fusion GFP-H2B, ce qui nous a permis de suivre la progression mitotique par vidéo-microscopie en temps réel. Nous montrons que la déplétion de PARP-3 conduit à un allongement important de la durée de la mitose dû à un ralentissement, voire un blocage, de la mitose en prométaphase et en métaphase. Cette altération de la mitose peut induire des catastrophes mitotiques aboutissant à la mort cellulaire.

2.4. PARP-3 est impliquée dans la surveillance du fuseau mitotique :

Un dysfonctionnement de la progression mitotique peut être dû à une anomalie de formation ou de stabilité du fuseau mitotique. Il a été établi que NuMA et la Tankyrase-1 sont nécessaires à la mise en place d'une structure pleinement fonctionnelle de ce fuseau. PARP-3 jouant un rôle central dans la régulation de la Tankyrase-1 et de NuMA, cette enzyme pouvait également avoir un impact sur le fuseau mitotique et son fonctionnement.

En accord avec cette hypothèse, nous avons pu observer une augmentation spontanée du nombre de mitoses anormales en absence de PARP-3, et l'apparition de fuseaux mitotiques

désorganisés. En outre, l'absence de PARP-3 induit un ralentissement de la polymérisation du fuseau mitotique.

En revanche, l'absence de PARP-3 n'empêche pas une localisation tout à fait normale de NuMA et de la Tankyrase-1 au niveau des pôles du fuseau mitotique. Il est à noter que nous avons également pu observer la localisation de PARP-3 au niveau des pôles mitotiques, mais pas dans toutes les lignées cellulaires : nous avons été en mesure de détecter une telle localisation dans les cellules HeLa (**figure 32**), mais ce ne fut pas le cas dans les cellules MRC5.

L'ensemble de ces résultats montre donc que PARP-3 est impliquée dans la dynamique du fuseau mitotique, via vraisemblablement son action régulatrice du complexe mitotique Tankyrase-1/NuMA.

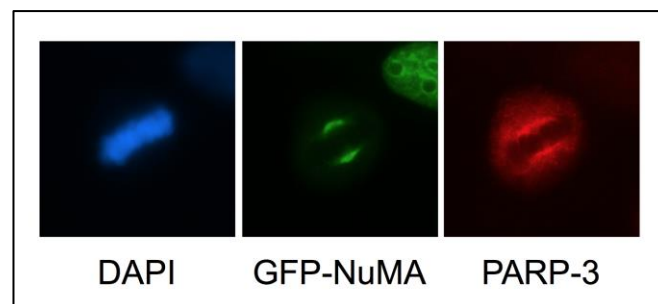


Figure 32 : Localisation de PARP-3 aux pôles du fuseau mitotique dans les cellules HeLa :

Le marquage au DAPI marque l'ADN ici regroupé au niveau de la plaque métaphasique. La protéine de fusion GFP-NuMA ainsi que PARP-3, détectée par un anticorps anti-PARP-3, sont localisées aux pôles du fuseau mitotique.

2.5. PARP-3 est impliquée dans la surveillance de l'intégrité télomérique :

La Tankyrase-1 est également connue pour son rôle dans la surveillance de l'intégrité des télomères à travers la poly(ADP-ribosyl)ation de TRF1, protéine empêchant le recrutement de la télomérase au niveau des télomères (Smith et al., 1998). Nous avons pu voir que PARP-3 est capable de moduler l'activité de la Tankyrase-1. Il était donc possible de découvrir une implication de PARP-3 dans la surveillance de l'intégrité télomérique.

Une analyse télo-FISH sur des étalements métaphasiques nous a permis de montrer une augmentation significative et spontanée des fusions entre chromatides sœurs et des pertes de télomères en absence de PARP-3, révélant une instabilité télomérique.

Dans le but de vérifier si ce phénotype est dû à l'apparition spontanée des DSB observées dans les cellules PARP-3^{kd} (Chapitre I, paragraphe 2.1) et localisées spécifiquement sur les télomères, nous avons utilisé un double marquage immunofluorescent de γ H2AX, marqueur des DSB, et de TRF2, marqueur des télomères, dans les lignées MRC5 PARP-3^{kd} par rapport aux lignées contrôle (**figure 33**). Aucune colocalisation entre les foyers γ H2AX et TRF2 n'a pu être observée, ce qui semble indiquer que l'instabilité télomérique détectée en absence de PARP-3 ne résulte pas de l'apparition spontanée de DSB sur ces régions.

Toutefois, il a été proposé que les phénomènes de fusions télomériques relèvent d'un dysfonctionnement du NHEJ (Smogorzewska et al., 2002 ; Celli et al., 2005). Or PARP-3 intervenant dans ce mécanisme de réparation, il est possible que PARP-3 régule le NHEJ associé aux télomères. Enfin, l'instabilité télomérique observée après déplétion de PARP-3 pourrait être due également à l'absence de régulation de l'activité de la Tankyrase-1 par PARP-3.

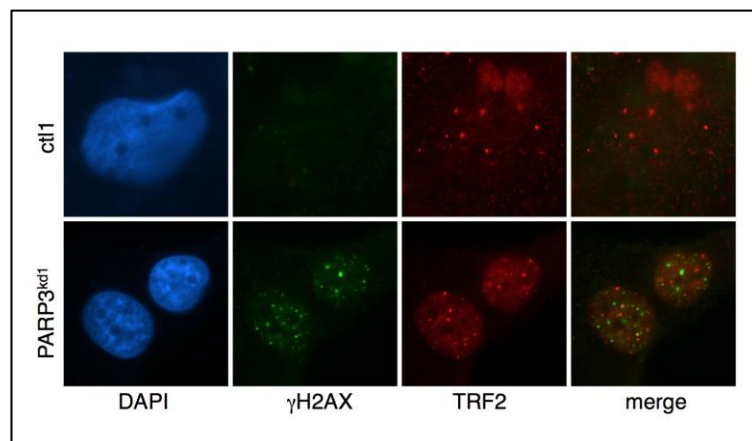


Figure 33 : Les DSB spontanées dues à l'absence de PARP-3 ne sont pas localisées au niveau des télomères :

GammaH2AX (vert) est un marqueur des DSB ; TRF2 (rouge) est une protéine localisée au niveau des télomères. Il n'y a pas de colocalisation des 2 signaux (merge).

3. Discussion et perspectives :

3.1. Deux isoformes d'une même enzyme pour deux mécanismes cellulaires différents :

Ce volet de notre étude nous a permis de dégager un second rôle de PARP-3 dans la régulation d'un complexe PARP-3/Tankyrase-1/NuMA intervenant dans la progression mitotique.

De manière schématique, PARP-3 intervient dans 2 mécanismes distincts et a 2 fonctions différentes :

- Une fonction de surveillance de l'intégrité du génome via son implication dans les mécanismes de réparation des DSB (voir Chapitre I).
- Une fonction de régulation du complexe PARP-3/Tankyrase-1/NuMA impliqué dans la progression mitotique.

Connaissant l'existence des 2 isoformes de PARP-3, une isoforme courte de localisation nucléaire et une isoforme longue de localisation centrosomale, il serait tentant de conclure que l'isoforme courte est celle intervenant dans la réparation des DSB au niveau du noyau et que l'isoforme longue est celle régulant le complexe PARP-3/Tankyrase-1/NuMA au cours de la mitose au niveau des pôles du fuseau mitotique.

Toutefois, pour confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire de procéder à des tests de complémentation. Ceci est théoriquement réalisable en effectuant une transfection de plasmides codant soit pour l'une soit pour l'autre isoforme dans les cellules MRC5 PARP-3^{kd} et en veillant à ce que les produits de transcription de tels plasmides ne soient plus la cible du shRNA utilisé précédemment et qui cible indistinctement les ARNm endogènes codant pour les 2 isoformes.

3.2. NuMA, un partenaire de PARP-3 encore peu décrit :

L'essentiel des études menées jusqu'à présent sur NuMA se sont focalisées sur son rôle primordial au cours de la mitose. Le rôle nucléaire de NuMA en interphase est moins bien caractérisé, mais il a été émis l'hypothèse que NuMA puisse servir de « charpente » au sein de la matrice nucléaire, et capable par la même de structurer le génome. En effet, NuMA est une protéine capable de lier les régions des chromosomes associées à la matrice nucléaire

(Matrix Attachment Region-binding protein). Cette interaction ainsi que d'autres observations (voir Introduction) soutiennent la théorie selon laquelle NuMA est susceptible de jouer un rôle dans l'organisation du génome (Ludérus et al., 1994 ; Radulescu and Cleveland, 2010). Nous avons vu que PARP-3 est capable d'hétéromodifier NuMA en présence d'ADN, ce qui pourrait indiquer un rôle de l'ADP-ribosylation de NuMA dans le noyau cellulaire en interphase. Il peut être envisagé que, telle la Tankyrase-1 et son PAR au niveau du fuseau mitotique, l'ADP-ribose synthétisé par PARP-3 servirait à ponter les différentes molécules de NuMA entre elles à proximité de l'ADN et ceci afin d'organiser la dynamique de cette charpente nucléaire, et donc par conséquent celle du génome également.

La structure du noyau est essentielle pour organiser et réguler les processus nucléaires et est souvent altérée dans les cellules cancéreuses (Zink et al., 2004).

Il a été montré qu'une perturbation de la structure nucléaire résultant d'un changement de morphologie cellulaire aura un impact sur les mécanismes de transcription des gènes et la synthèse protéique (Thomas et al., 2002). L'adhésion cellulaire, dépendante de nombreuses protéines de liaison à la matrice extracellulaire et aux cellules voisines, pourrait donc être altérée. Réciproquement, la géométrie d'adhésion cellulaire régule la morphologie nucléaire via un réseau périnucléaire d'actine dans les fibroblastes (Khatau et al., 2009). L'adhérence et les morphologies cellulaire et nucléaire sont donc interconnectées.

En accord avec l'hypothèse d'un rôle de PARP-3 via NuMA dans le maintien de la morphologie nucléaire, des tests d'adhérence cellulaire effectués au laboratoire ont montré que les cellules PARP-3^{kd} présentent un défaut d'adhérence par rapport aux lignées contrôle (résultats non montrés). Des analyses structurales comparatives entre noyaux de cellules contrôle et de cellules PARP-3^{kd} permettraient de vérifier cette hypothèse.

Nous avons montré que PARP-3 est capable d'hétéromodifier NuMA au niveau de son extrémité C-terminal. En outre, il a été montré que NuMA peut lier l'ADP-ribose produit par la Tankyrase-1 via son domaine Coiled-coil (Chang et al., 2009). Les polymères produits par ces 2 PARPs ont toutefois des structures différentes. On peut donc légitimement se demander si NuMA est également capable de lier l'ADP-ribose généré par PARP-3.

Pour vérifier si NuMA est capable de se lier au polymère produit par PARP-3, une expérience de « Dot-blot » peut être envisagée. Après surexpression et purification, il serait possible de spotter nos différentes protéines de fusion GFP-NuMA sur une membrane de nitrocellulose. Puis ces spots seraient mis en présence de poly(ADP-ribose) radioactif généré

par PARP-3. Enfin, une analyse par autoradiographie nous permettrait de savoir si NuMA peut lier le PAR de PARP-3, et si oui avec quel domaine.

4. Conclusion :

Nos études ont permis de mettre en évidence l'existence d'un complexe multi-protéique dont l'activité est régulée par PARP-3. Ce complexe joue un rôle essentiel dans la mise en place et la maintenance du fuseau mitotique, et par conséquent dans la progression de la mitose. Nous avons également pu relever un rôle de PARP-3 dans la maintenance de l'intégrité télomérique.

Nos travaux ont montré que PARP-3 est impliquée dans au moins 2 processus physiologiques indispensables à la survie de la cellule : la réparation des DSB (Chapitre I) et la progression mitotique (Chapitre II). Ces découvertes nous ont fait envisager PARP-3 comme une potentielle cible en thérapie du cancer. Cette approche est détaillée dans le chapitre suivant.

CHAPITRE III

Rôle de PARP-3 dans la stabilité génomique : vers une possible cible en thérapie du cancer ?

1. Introduction :

Le cancer est la première cause de décès prématuré avant 65 ans en France. Le cancer du poumon et le cancer du sein sont la première cause de décès (toutes causes confondues) respectivement chez l'homme et chez la femme (Rapport de l'Institut National du Cancer – La situation du cancer en France en 2011).

La recherche de nouvelles thérapies du cancer est indispensable et relève d'une vraie problématique de santé publique.

1.1. Intérêt des inhibiteurs de PARPs en thérapie du cancer :

L'inhibition des PARPs, et surtout de PARP-1, représente aujourd'hui un intérêt thérapeutique majeur i) d'une part en potentialisant l'action génotoxique des anti-tumoraux clastogènes tels que les radiations ionisantes et le Témzolomide (Rouleau et al., 2010 ; Dantzer et al., 2011) et ii) d'autre part, dans le ciblage des cancers (sein et ovaires) présentant une mutation des gènes codant pour des protéines du HR telles que BRCA1 et BRCA2, par un mécanisme dit de létalité synthétique (McCabe et al., 2006 ; Chionh et al., 2011).

1.1.1. Approche fondée sur le principe de létalité synthétique :

Il a été observé que PARP-1 est souvent surexprimée dans les cancers, indiquant un possible rôle de cette enzyme dans les mécanismes de croissance, de prolifération, voire de

survie cellulaire via son activité dans la surveillance de l'intégrité du génome (Virág and Szabó, 2002).

Comme nous l'avons vu, PARP-1 a été initialement décrite comme une enzyme nécessaire à la réparation des SSB. L'inhibition d'une telle enzyme pouvait donc sembler profitable à la thérapie de plusieurs cancers, dont ceux possédant déjà un mécanisme de réparation des DSB génétiquement défaillant.

Cette hypothèse de travail se basait sur la notion de létalité synthétique, suivant laquelle une déficience en 2 gènes (suite à une mutation génomique, à l'impossibilité d'obtenir un produit d'expression ou à l'inhibition de l'activité de l'enzyme exprimée le cas échéant) conduit à la mort cellulaire, alors qu'un défaut dans l'expression d'un seul de ces 2 gènes n'est pas suffisant pour induire cette létalité.

La létalité synthétique est un principe largement exploité dans les essais cliniques actuels impliquant les inhibiteurs PARP visant à potentialiser les traitements contre le cancer au sens large. Ces inhibiteurs compétitifs sont des molécules mimant le NAD^+ , substrat naturel des PARPs.

Plusieurs études expérimentales *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs PARP induisait une cytotoxicité dans les lignées cancéreuses déficientes en HR (Bryant et al., 2005 ; Farmer et al., 2005) voire dans des tumeurs humaines xéno greffées (Fong et al., 2009).

Malgré leur potentiel thérapeutique, le développement et les tests cliniques afférents des inhibiteurs PARP connaissent des hauts et des bas. Après des études de phase II prometteuses sur les patients atteints de cancer du sein à cellules Triples Négatives (O'Shaughnessy et al., 2011), l'Iniparib n'a pas donné entière satisfaction lors de tests cliniques de phase III (voir la section Annexes pour de plus amples précisions sur les phases de test clinique) (Javle and Curtin, 2011). Toutefois, il ne faut pas transposer les résultats négatifs de l'Iniparib sur les autres inhibiteurs PARP en développement.

Si les inhibiteurs PARP ont pour attrait d'induire relativement peu d'effets secondaires indésirables, ils ne sont pour l'instant guère précis dans leur mécanisme d'inhibition, puisqu'ils ne sont pas spécifiques d'une PARP en particulier (à l'exception de l'inhibiteur XAV939 capables d'inhiber spécifiquement les 2 Tankyrases) (Wahlberg et al., 2012).

Si cet état de fait n'est pas fondamentalement gênant pour induire une mort tumorale, cette « aspécificité » relative demeure toutefois embarrassante sur i) un plan strictement

fondamental pour déterminer précisément quels mécanismes sont mis en jeu au cours de l'induction d'une létalité synthétique ii) et sur un plan plus pratique pour réguler finement l'impact d'un traitement sur la tumeur traitée et donc sur le patient.

1.1.2. Adaptabilité des cellules cancéreuses aux inhibiteurs PARP :

Les cellules tumorales présentent très souvent des facultés d'adaptation étonnantes et peuvent devenir résistantes à un traitement précis au fil du temps. Ce phénomène a également été observé dans le cas de traitements avec des inhibiteurs PARP.

Des études ont montré que :

- des cellules portant une mutation dans le gène codant pour BRCA2 et préalablement sensible aux traitements par inhibiteurs PARP pouvait s'en affranchir par génération d'une nouvelle isoforme de BRCA2 (Edwards et al., 2008).

- 53BP1 peut être très peu exprimée dans des cellules cancéreuses mutées pour BRCA1, et parmi lesquelles des cellules Triples Négatives (cette catégorie de cellules tumorales sera présentée dans les paragraphes suivants). Cette diminution de l'expression de 53BP1 a pour effet une réactivation partielle du HR, que les auteurs détectent par une restauration des foyers RAD51 dans ces cellules déficientes en BRCA1 après exposition à des radiations ionisantes. D'autre part, l'absence de BRCA1 peut aboutir à une accumulation de DSB non réparées, ce qui bloquera la cellule tumorale en phase G2. Or en absence de 53BP1 ce blocage n'a plus lieu, permettant à la cellule de poursuivre son cycle malgré les dommages de l'ADN (Bouwman et al., 2010).

Par conséquent, la perte de 53BP1 induit également une résistance des cellules mutées en BRCA1 aux inhibiteurs PARP, du fait de cette réactivation du HR (Bunting et al., 2010).

- un traitement à court terme d'un modèle murin du cancer du sein muté pour BRCA1 à l'inhibiteur PARP Olaparib stoppe la croissance tumorale et augmente la survie de l'animal. En revanche, un traitement à long terme avec le même inhibiteur induit une surexpression des gènes *Abcb1a* et *b* codant pour la P-glycoprotéine. Cette dernière est un transporteur permettant l'efflux d'agents pharmacologiques et est impliquée dans les phénomènes de résistance aux drogues. En l'occurrence les tumeurs sont alors moins sensibles à l'inhibiteur PARP, tandis que l'utilisation d'un inhibiteur de la P-glycoprotéine a pour conséquence de lever la résistance à l'Olaparib (Rottenberg et al., 2008).

Il est donc absolument nécessaire de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer de nouveaux traitements anticancéreux dans un souci d'efficacité constante.

1.2. Intérêt du ciblage de PARP-3 dans des cellules cancéreuses mammaires :

Nous avons pu montrer que PARP-3 intervient spécifiquement dans la réparation des DSB via le mécanisme du NHEJ. BRCA1 est connu pour être un acteur essentiel du HR. Or BRCA1 peut être muté dans des cancers ovariens ou du sein humains ; ces cellules cancéreuses sont donc incapables de réparer des DSB par le biais du HR. Suivant le principe de létalité synthétique, nous avons alors émis l'hypothèse que le ciblage de PARP-3 dans de telles lignées induirait une forte mortalité cellulaire, aussi bien spontanément que suite à un traitement induisant des DSB (**figure 34**).

1.3. Les différentes catégories de lignées cancéreuses du sein humain :

Il existe une grande variété de lignées cellulaires de cancer du sein. Pour tenter de simplifier l'hétérogénéité de ces cellules, elles ont été intégrées dans diverses catégories en fonction de leur morphologie, de leur expression endogène de diverses protéines et de leurs récepteurs membranaires. Il est à préciser que ces classifications peuvent parfois être sujettes à controverse (Rae et al., 2007 ; Blick et al., 2008).

Trois grandes classes se distinguent : les cellules « luminales », et les cellules « basales » A ou B (Neve et al., 2006 ; Kenny et al., 2007) (**figures 35 et 36**).

i) Les cellules Luminales :

La principale caractéristique de ces cellules est qu'elles ont une structure et des interactions de type épithélial. Disposant de jonctions cellulaires organisées, leur capacité de migration est donc plus réduite, ce qui en fait des cellules généralement moins invasives que celles présentées ci-après.

ii) Les cellules Basales A :

Ces cellules sont des cellules dites « intermédiaires », dans le sens où elles ne disposent pas de toutes les caractéristiques des cellules Basales B, mais sont malgré tout éloignées phénotypiquement des cellules Luminales.

Certaines cellules Basales A sont des cellules Triples Négatives, c'est à dire dépourvues de 3 types de récepteurs membranaires précis : ER, PR et HER2 (ER : Estrogène Receptor ; PR : Progesterone Receptor ; HER2 : Human Epithelial growth factor Receptor 2).

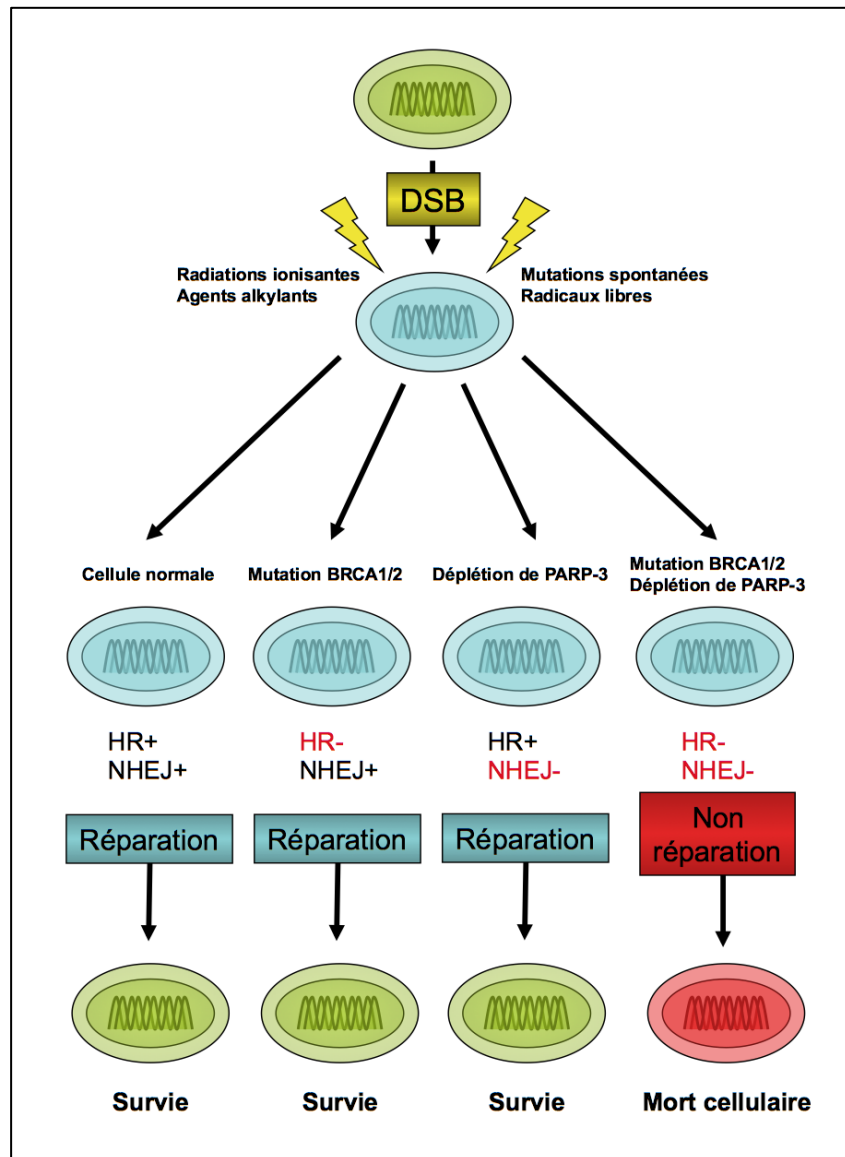


Figure 34 : Principe de la létalité synthétique appliqué à des cellules cancéreuses déficientes en HR dans lesquelles PARP-3 est déplétée :

Des DSB sont générées dans le génome des cellules cancéreuses soit spontanément soit à la suite d'un traitement génotoxique. Ces cassures seront réparées soit par le mécanisme du NHEJ, soit par celui du HR. Dans le cas où ces 2 mécanismes sont défaillants, les DSB demeurent et leur non-réparation peut aboutir à la mort cellulaire.

Ces récepteurs contrôlent de multiples aspects cellulaires ; l'œstrogène est impliquée dans l'induction de la croissance tumorale du cancer du sein ; la progestérone stimule les mécanismes de l'inflammation de la glande mammaire, ce qui en retour favorise le développement de cancer. HER2 est un récepteur orphelin mais est surexprimé dans 25% des cancers du sein (Slamon et al., 1987). Des thérapies endocrines anti-œstrogène sont utilisées pour traiter les cancers du sein

Ces voies cellulaires sont en partie interconnectées : l'œstrogène, par exemple, via ses récepteurs augmente l'expression des récepteurs à la progestérone (Kastner et al., 1990).

Ces récepteurs peuvent être la cible d'agents chimiothérapeutiques : le Tamoxifène se fixant au ER (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005), l'Onapristone, un antagoniste du PR (Robertson et al., 1999), et le Trastuzumab, anticorps monoclonal ciblant HER2 (Le et al., 2006) en sont des exemples. En effet, ces récepteurs sont en règle générale essentiels pour la croissance cellulaire, mais les lignées cancéreuses Triples Négatives ont réussi à se passer des mécanismes dépendants de ces récepteurs.

Ces cellules ne disposant d'aucun de ces récepteurs, elles ne sont plus tributaires des voies afférentes et elles peuvent être particulièrement résistantes à la chimiothérapie (Onitilo et al., 2009 ; Hudis and Gianni, 2011).

iii) Les cellules Basales B :

Ce sont les cellules ayant le phénotype le plus fibroblastique. En effet, elles expriment fortement la vimentine qui est un filament intermédiaire typique des fibroblastes. De plus, l'E-cadhérine, un composant majeur des jonctions adhérentes est peu exprimé, signe que les jonctions intercellulaires sont bien moins organisées que dans des cellules épithéliales. Ce phénotype fibroblastique leur alloue une bien plus grande possibilité de migration et donc d'invasion.

Une partie des lignées de cellules Basales B comprend des cellules Triples Négatives. Ceci en fait les cellules les plus délétères, combinant des possibilités de migration et une résistance accrue à la chimiothérapie. Ces cellules sont donc considérées comme potentiellement les plus « agressives » vis-à-vis du patient.

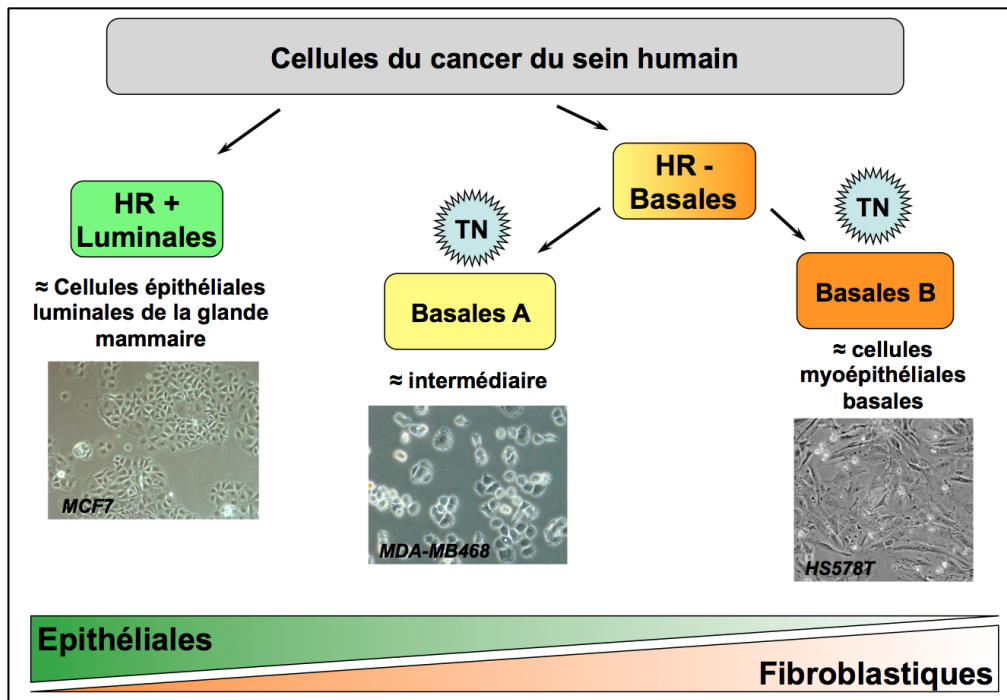


Figure 35 : Les différentes catégories de cellules de cancer du sein :

HR : Hormone Receptors ; TN : cellules potentiellement Triples Négatives

Les images représentatives de lignées cellulaires pour chaque classe ont été prises par microscopie optique.

Les cellules Triples Négatives sont responsables d'un taux élevé de métastases au niveau viscéral et au niveau du système nerveux central, d'où un pronostic de survie réduit (Dent et al., 2009). En outre, une grande partie des cancers du sein associés à la mutation de BRCA1 est composée de cellules Triples Négatives et fibroblastiques (Anders and Carey, 2008). Si la perte des récepteurs membranaires ER, PR et HER2 peut être un avantage pour de telles cellules agressives, la mutation/perde de BRCA1 peut par contre apparaître comme leur point faible principal. Point faible dont nous espérons tirer parti en ciblant PARP-3 dans de telles cellules.

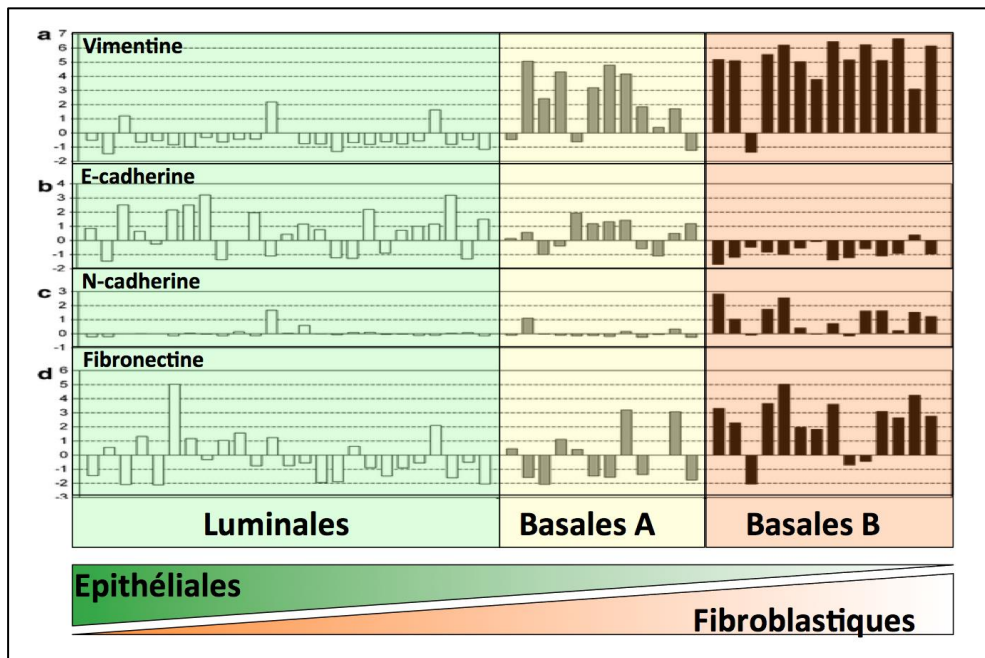


Figure 36 : Marqueurs utilisés pour classifier les cellules de cancer du sein : D'après (Blick et al., 2008).

- Vimentine : filament intermédiaire caractéristique des fibroblastes
- E-Cadherine (E pour Epithélial) : glycoprotéine, composant des jonctions adhérentes (zonulas adherens) entre les cellules épithéliales
- N-Cadherine (N pour Neural) : glycoprotéine permettant des jonctions entre cellules par liaison homotypique. Tout comme l'E-Cadherine, elle intervient dans les mouvements morphogénétiques au cours du développement et contrôle l'adhésion intercellulaire. De façon intéressante, l'augmentation de l'expression de la N-Cadherine induit la motilité de la cellule (Derycke and Bracke, 2004).
- Fibronectine : glycoprotéine permettant l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire

2. Résultats :

2.1. PARP-3 est fortement exprimée dans les lignées cancéreuses mammaires dites agressives :

Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression endogène de PARP-3 dans différentes lignées de cancer du sein de type Luminal (MCF7), Basales A (HCC 1937, MDA-MB 468) ou Basales B Triples Négatives (MDA-MB 231, MDA-MB 436, HS578T) mutées ou non pour la protéine du HR, BRCA1 (**figure 37**).

Nous avons observé que cette expression augmente avec l'agressivité de la lignée tumorale. En effet, PARP-3 est exprimée dans les lignées cancéreuses Basales A et Basales B,

les lignées les plus agressives, mais très peu dans la lignée Luminale. De manière intéressante, son expression est plus importante dans les lignées cancéreuses Basales B.

Il en est de même pour l'expression endogène de la Tankyrase-1. Ce dernier résultat avait déjà été décrit dans une étude antérieure portant sur des biopsies de cancer du sein humain (Gelmini et al., 2004).

Il est également à noter que les expressions endogènes de PARP-3 et de la Tankyrase-1 ne sont pas corrélées au statut muté ou non de BRCA1 car, pour une même classe, leurs expressions semblent équivalentes entre une lignée mutée pour BRCA1 et une lignée non mutée.

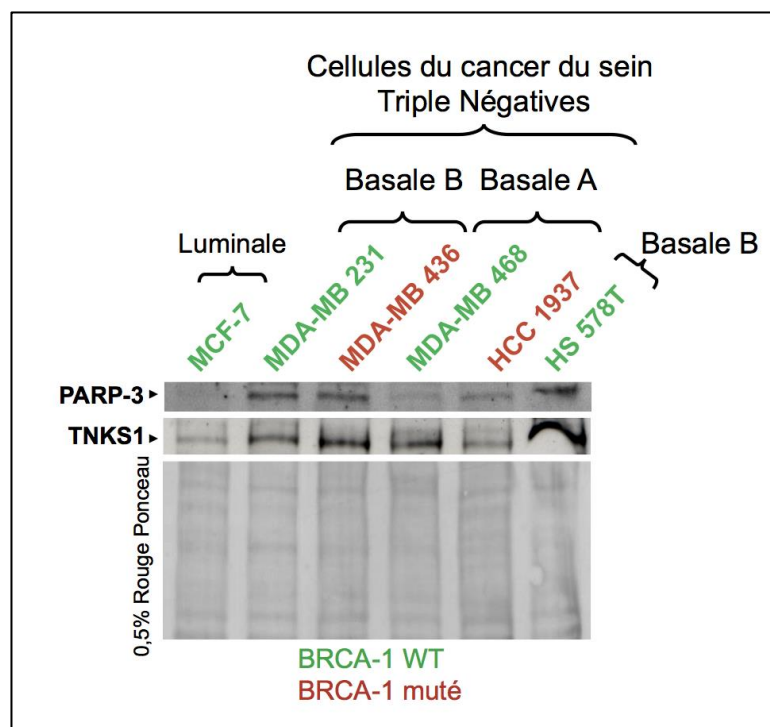


Figure 37 : Expressions endogènes de PARP-3 et de la Tankyrase-1 dans diverses lignées cancéreuses :

Les lignées disposant d'une forme normale de BRCA1 (WT : Wild Type) sont indiquées en vert. Les lignées mutées pour BRCA1 sont indiquées en rouge. TNKS1 : Tankyrase-1

En raison de l'expression très importante de PARP-3 dans les lignées tumorales de type Basale B et de leur agressivité, nous avons choisi d'utiliser cette classe de lignées cellulaires dans nos études suivantes.

2.2. La déplétion de PARP-3 induit une forte diminution du taux de survie des cellules cancéreuses mutées en BRCA1 :

Nous avons ensuite comparé l'impact d'une déplétion de PARP-3 dans la lignée mutée pour BRCA1 (MDA-MB 436) par rapport aux lignées de même classe mais dont l'expression de BRCA1 est normale (MDA-MB 231, HS 578T).

Des recherches ont montré que la mutation de BRCA1 dans les cellules MDA-MB 436 consiste en une substitution modifiant le site donneur d'épissage alternatif de l'exon 20 du gène de BRCA1, ce qui donne naissance à 2 transcrits anormaux (Elstrodt et al., 2006).

Ces lignées ont été transfectées de manière transitoire avec un siRNA dirigé contre l'ARNm de PARP-3 (siPARP-3) ou un siRNA contrôle dont la séquence est aléatoire (scr). Après 72 heures de transfection, un test de survie cellulaire par clonogénicité a été réalisé, avec ou sans traitement préalable à l'Etoposide (**figure 38**). Pour chaque lignée, la déplétion de PARP-3 a été vérifiée par Western Blot (encart). Dans chaque cas, nous avons observé une diminution significative de l'expression de PARP-3 (siPARP-3) par rapport aux lignées contrôle (scr).

La déplétion de PARP-3 induit une diminution spontanée du taux de survie dans les lignées non mutées pour BRCA1, de l'ordre de 30% pour les cellules MDA-MB 231 et de l'ordre de 50% pour les cellules HS 578T. Cette diminution est bien plus importante dans les cellules MDA-MB 436, atteignant 70%.

L'effet de la déplétion de PARP-3 sur la survie cellulaire de ces 3 lignées est encore potentialisé par un traitement à l'Etoposide générateur de DSB, aboutissant alors à une quasi-disparition des cellules MDA-MB 436, mais également, de façon plus surprenante, des cellules HS 578T.

Ces expériences suggèrent que la déplétion de PARP-3 entraîne une létalité cellulaire significativement amplifiée dans les cellules tumorales mammaires mutées pour BRCA1 par rapport à des cellules tumorales mammaires dans lesquelles l'expression de BRCA1 est normale.

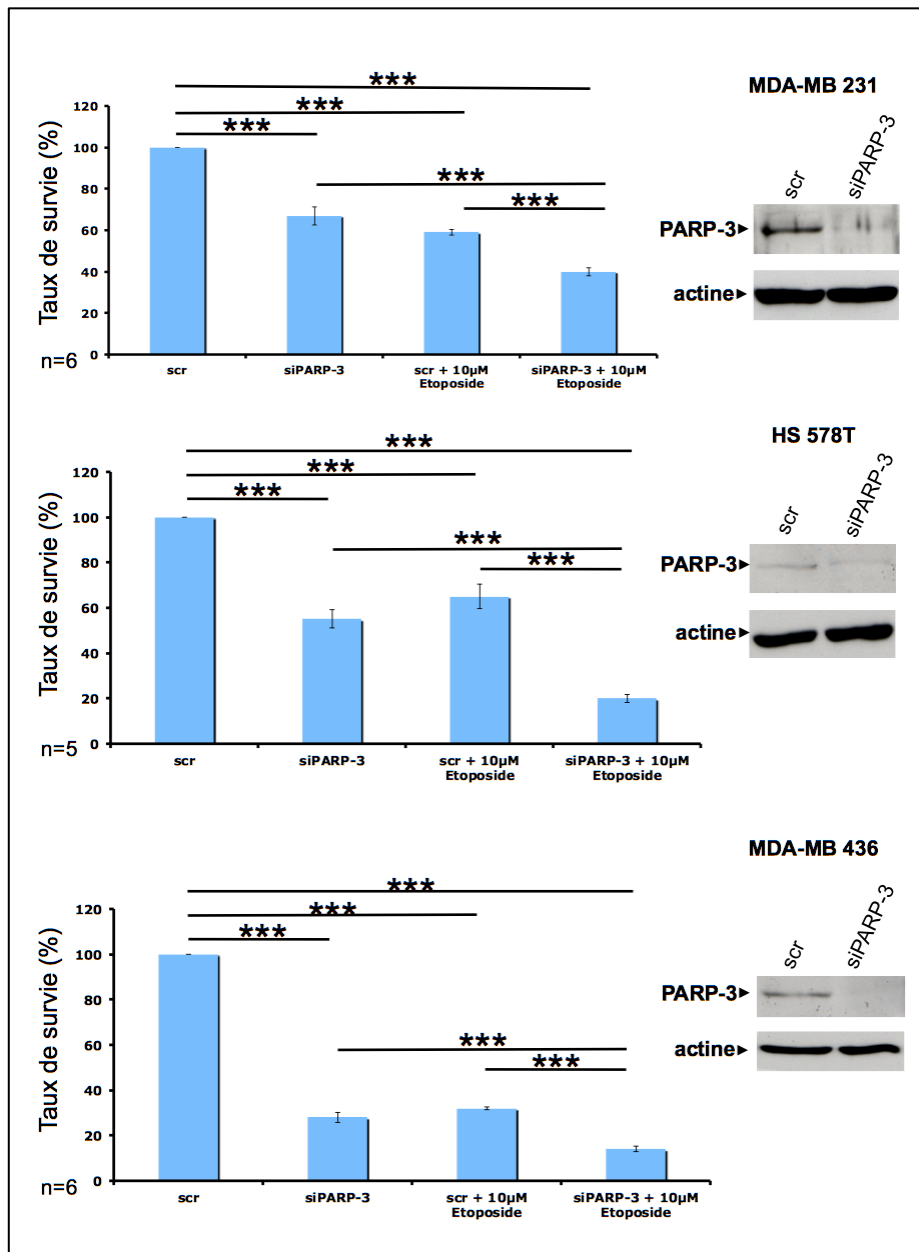


Figure 38 : La déplétion de PARP-3 induit une forte létalité dans les lignées cancéreuses mutées en BRCA1 :

Les graphiques de gauche représentent les taux de survie des lignées dans les différentes conditions expérimentales :

- scr (scramble) : transfection d'un siRNA contrôle ne ciblant aucun ARNm
- siPARP-3 : transfection d'un siRNA dirigé contre l'ARNm de PARP-3
- Etoposide : traitement d'une heure à l'Etoposide à la concentration indiquée

Les images de Western Blot de droite indiquent la diminution de l'expression endogène de PARP-3 après traitement avec un siRNA ciblant l'ARNm de PARP-3 comparée à la condition contrôle (scr) dans les 3 lignées cellulaires. Les expériences ont été réalisées 5 à 6 fois, donnant des résultats similaires. *** P<0,001

2.3. La déplétion conjointe de PARP-3 et de BRCA1 ou RAD51 induit spontanément une forte diminution du taux de survie des lignées cancéreuses mammaires Basales B :

La lignée MDA-MB 436 est une lignée qui est naturellement mutée pour BRCA1. Il est donc tout à fait envisageable qu'elle se soit adaptée à cette condition, réorganisant ses mécanismes cellulaires et son transcriptome. En effet, elle est phénotypiquement différente des lignées MDA-MB 231 et HS 578T, elles-mêmes différentes l'une de l'autre.

La déplétion de PARP-3 dans la lignée MDA-MB 436 mutée en BRCA1 entraîne une diminution significative de sa survie. Pour confirmer que ce phénotype est bien dû à l'absence d'une protéine BRCA1 fonctionnelle et non à d'autres mutations potentielles sur d'autres gènes, nous avons réalisé une double déplétion de PARP-3 et de BRCA1 dans les cellules de type basales B (MDA-MB 321 et HS 578T).

Pour cela, ces cellules ont été cotransfectées avec les siRNA spécifiques des ARNm de PARP-3 (siPARP-3) et BRCA1 (siBRCA1) ou avec un siRNA non spécifique (scr). Après 72 heures de transfection, un test de survie cellulaire par clonogénicité a été réalisé. Les déplétions de PARP-3 et de BRCA1 ont été vérifiées par RT-qPCR. Dans les 2 cas, l'efficacité de la déplétion de PARP-3 et de BRCA1 est satisfaisante (**figure 39**).

La déplétion de PARP-3 dans les cellules MDA-MB 231 induit une diminution de leur survie cellulaire de 30% par rapport aux cellules contrôle et la déplétion de BRCA1 une diminution de 40%. De manière significative, la déplétion simultanée de ces 2 protéines entraîne une diminution plus importante de l'ordre de 60%, suggérant un effet additif de la déplétion de ces 2 protéines.

Nous retrouvons un résultat similaire dans les cellules HS 578T. La déplétion de PARP-3 induit une diminution de la survie cellulaire de 50% dans ces cellules, et celle de BRCA1 une diminution de 25%. De manière significative, la déplétion simultanée de ces 2 protéines conduit à une mort cellulaire plus importante de l'ordre de 70%, suggérant là aussi un effet additif de la déplétion de ces 2 protéines.

Ces expériences révèlent que la déplétion conjointe de PARP-3 et de BRCA1 induit une létalité cellulaire significativement amplifiée. Ceci suggère que l'effet délétère exacerbé de la déplétion de PARP-3 observé précédemment dans la lignée MDA-MB 436 est bien lié au statut muté de BRCA1.

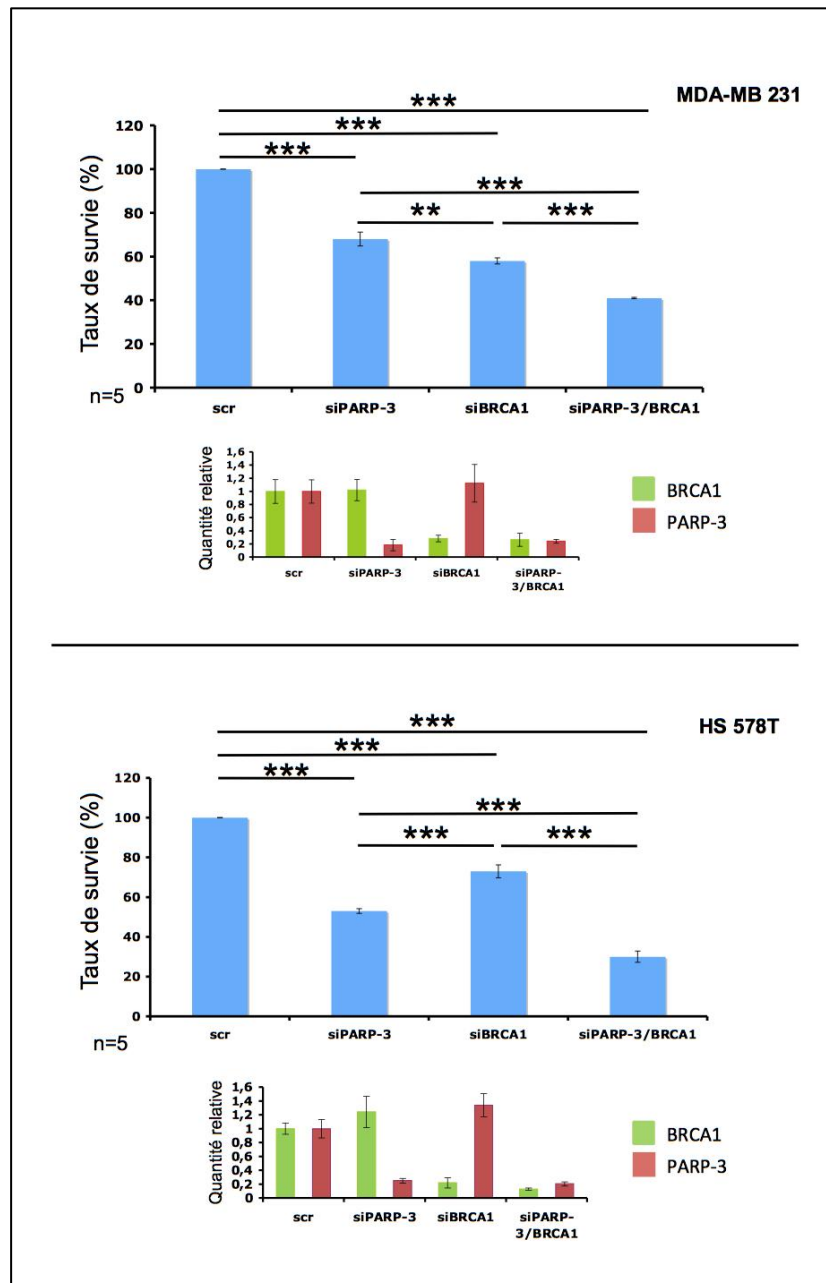


Figure 39 : La déplétion conjointe de PARP-3 et BRCA1 induit une forte létalité dans les lignées cancéreuses non-mutées en BRCA1 :

Les graphiques aux colonnes bleues représentent les taux de survie des lignées dans les différentes conditions expérimentales :

- scr (scramble) : transfection d'un siRNA contrôle ne ciblant aucun ARNm
- siPARP-3 : transfection d'un siRNA dirigé contre l'ARNm de PARP-3
- siBRCA1 : transfection d'un siRNA dirigé contre l'ARNm de BRCA1
- siPARP-3/BRCA1 : transfection de siRNA dirigés contre les ARNm de PARP-3 et de BRCA1

L'efficacité de l'anticorps anti-BRCA1 dont nous disposons n'étant pas satisfaisante, nous avons vérifié les déplétions protéiques via une analyse par RT-PCR quantitative permettant de relever la quantité d'ARNm des protéines d'intérêt, ici PARP-3 et BRCA1. Les résultats de cette analyse sont indiqués dans les graphiques aux

colonnes vertes et brunes. Les expériences ont été réalisées 5 fois, donnant des résultats similaires. ** P<0,01 ;
*** P<0,001

BRCA1 est un acteur majeur du HR. Dans le but d'analyser l'impact d'une déplétion de PARP-3 dans des cellules dont la réparation par HR n'est pas fonctionnelle, nous avons analysé l'impact d'une double déplétion de PARP-3 avec un autre acteur clé du HR, RAD51. Pour cela, les cellules MDA-MB 231 ont été transfectées avec des siRNA spécifiques des différents ARNm (siPARP-3 et siRAD51) ou avec un siARN non spécifique (scr). Après 72h de transfection, des tests de survie cellulaire par clonogénicité ont été réalisés et les déplétions protéiques ont été suivies par Western Blot (**figure 40**). Les déplétions en PARP-3 et RAD51 sont satisfaisantes, comme cela est observé sur les Western Blot (encart).

La déplétion de RAD51 s'avère déjà très toxique spontanément, avec une diminution de près de 70% de la viabilité. La double déplétion PARP-3/RAD51 s'avère encore plus délétère, ramenant le taux de survie cellulaire à 10%, et suggérant un effet additif de la déplétion de ces protéines.

Ces résultats semblent confirmer que le ciblage de PARP-3 dans une optique de létalité synthétique est une démarche efficace puisque l'altération du HR par déplétion de BRCA1 ou RAD51 couplée à la déplétion de PARP-3 induit une mortalité cellulaire très importante. Toutefois la forte toxicité de la simple déplétion de RAD51 réclame la prudence quant à l'interprétation des résultats, et il sera nécessaire de les confirmer via la déplétion d'un autre acteur du HR (ex : RAD54 ou BRCA2).

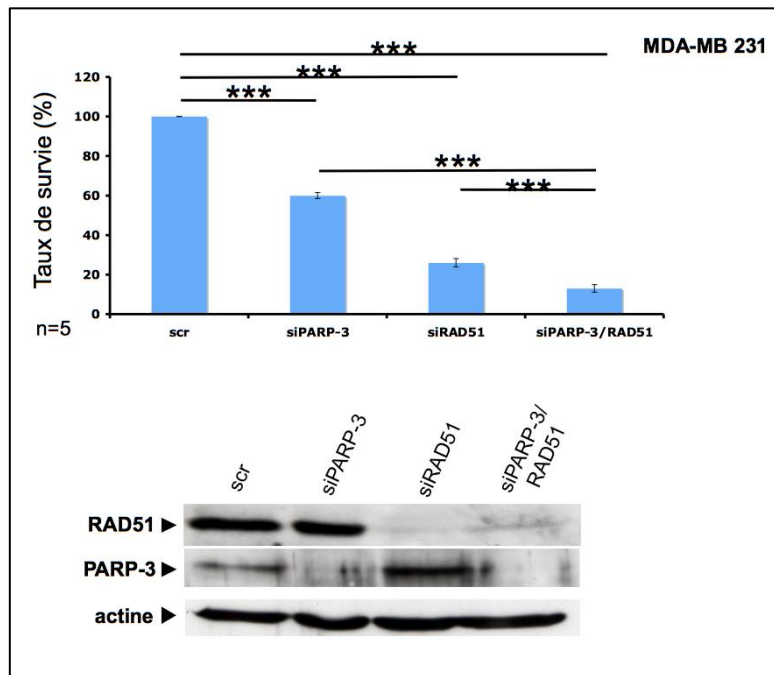


Figure 40 : La double déplétion de PARP-3 et RAD51 induit une forte létalité des cellules cancéreuses non-mutées en BRCA1 :

Le graphique représente les taux de survie des cellules dans les différentes conditions expérimentales :

- scr (scramble) : transfection d'un siRNA contrôle ne ciblant aucun ARNm
- siPARP-3 : transfection d'un siRNA dirigé contre l'ARNm de PARP-3
- siRAD51 : transfection d'un siRNA dirigé contre l'ARNm de RAD51
- siPARP-3/RAD51 : transfection de siRNA dirigés contre les ARNm de PARP-3 et de RAD51

Les images de Western Blot en-dessous indiquent la diminution de l'expression endogène de PARP-3 et de RAD51 comparée à la condition contrôle (scr). Les expériences ont été réalisées 5 fois, donnant des résultats similaires. *** P<0,001

2.4. La déplétion de PARP-3 induit une amplification centrosomale exacerbée dans les cellules cancéreuses mutées en BRCA1 :

Il a été montré que BRCA1 est également impliqué dans le contrôle des phénomènes d'amplification centrosomale, phénomènes pouvant conduire à des aberrations mitotiques et à une mort cellulaire (Xu et al., 1999). Nous avons pu déterminer précédemment un rôle clé de PARP-3 dans la progression de la mitose et dans la maintenance de l'intégrité du fuseau mitotique. Nous avons alors voulu savoir si PARP-3 pouvait également être impliquée dans les phénomènes d'amplification centrosomale.

Pour cela, nous avons évalué le nombre de centrioles présents dans les cellules tumorales mutées (MDA-MB 436) ou non (HS 578T) pour BRCA1 après déplétion de PARP-3 par ARN interférence (siPARP-3) par rapport aux cellules transfectées avec un siRNA non spécifique (scr). Les centrioles sont détectés par marquage de la kinase mitotique p34cdc2 (protein 34 Cell Division Control 2) par immunofluorescence et analysés au microscope à épifluorescence (**figures 41 et 42**).

Le nombre de cellules présentant plus de 2 centrioles augmente de manière significative mais d'un facteur équivalent (2 fois) dans les 2 lignées après déplétion de PARP-3, signe d'une amplification centrosomale en absence de PARP-3.

Toutefois, le détail de cette amplification indique que cette dernière est bien plus importante dans les cellules MDA-MB 436 que dans les cellules HS 578T. En effet, les plus importantes amplifications n'atteignent que 6 centrioles par cellules dans les cellules HS 578T contre bien plus de 10 dans les cellules MDA-MB 436. Il a été possible d'observer des amplifications centrosomales allant jusqu'à plus de 40 centrosomes par cellule dans la lignée MDA-MB 436 en absence de PARP-3.

L'ensemble de ces résultats indique que la déplétion de PARP-3 induit une amplification centrosomale dans les lignées cancéreuses mammaires et que ce phénomène est amplifié lorsque les cellules présentent une déficience en BRCA1.

Cette implication de PARP-3 dans l'amplification centrosomale, ainsi que son rôle tenu dans la réparation des DSB, permet d'expliquer la forte décroissance spontanée du taux de survie dans les lignées du cancer du sein mutée pour BRCA1 après déplétion de PARP-3.

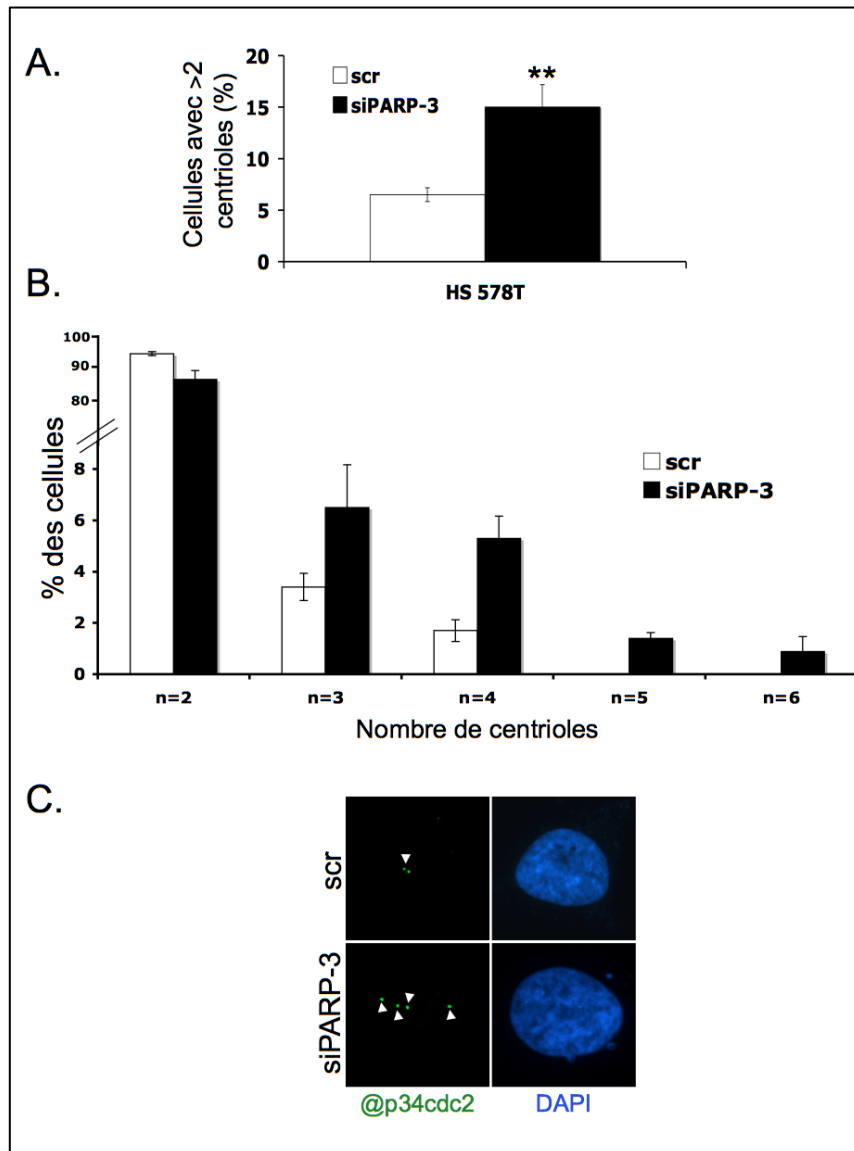


Figure 41 : Amplification centrosomale dans les cellules HS 578T après déplétion de PARP-3 :

A. La déplétion de PARP-3 induit une augmentation du nombre de cellules possédant plus de 2 centrioles.

scr : condition contrôle ; siPARP-3 : siRNA ciblant l'ARNm de PARP-3. ** P<0,01

B. La déplétion de PARP-3 induit une amplification centrosomale pouvant aller jusqu'à 6 centrioles par cellule.

scr : condition contrôle ; siPARP-3 : siRNA ciblant l'ARNm de PARP-3

C. Image d'immunofluorescence représentative de l'amplification centrosomale dans les cellules HS578T après déplétion de PARP-3. p34cdc2 est un marqueur centrosomal. scr : condition contrôle ; siPARP-3 : siRNA ciblant l'ARNm de PARP-3.

Une moyenne de 500 cellules a été comptée par condition et par expérience. Les expériences ont été réalisées 3 fois, donnant des résultats similaires.

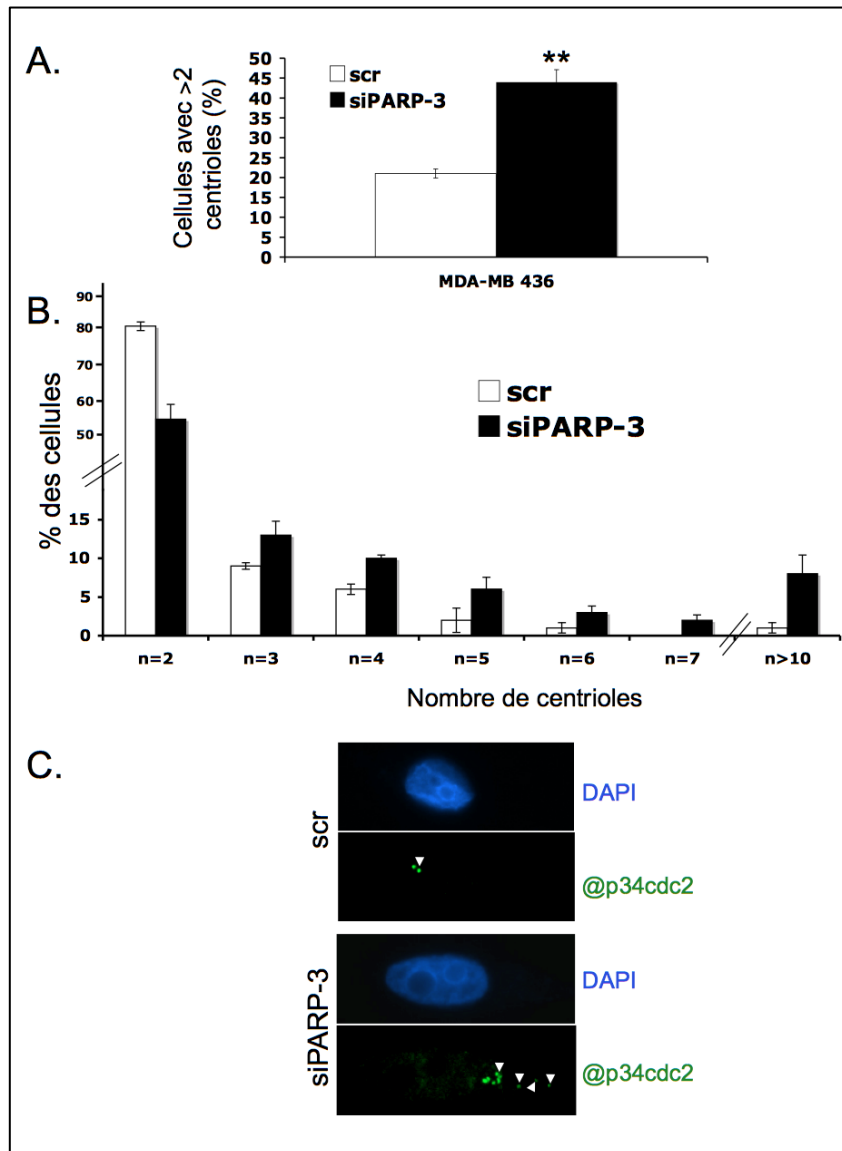


Figure 42 : Amplification centrosomale dans les cellules MDA-MB 436 après déplétion de PARP-3 :

A. La déplétion de PARP-3 induit une augmentation du nombre de cellules possédant plus de 2 centrioles.

scr : condition contrôle ; siPARP-3 : siRNA ciblant l'ARNm de PARP-3. ** P<0,01

B. La déplétion de PARP-3 induit une amplification centrosomale pouvant dépasser les 10 centrioles par cellule.

scr : condition contrôle ; siPARP-3 : siRNA ciblant l'ARNm de PARP-3

C. Image d'immunofluorescence représentative de l'amplification centrosomale dans les cellules MDA-MB436 après déplétion de PARP-3. p34cdc2 est un marqueur centrosomal. scr : condition contrôle ; siPARP-3 : siRNA ciblant l'ARNm de PARP-3.

Une moyenne de 500 cellules a été comptée par condition et par expérience. Les expériences ont été réalisées 3 fois, donnant des résultats similaires.

La présence de centrosomes surnuméraires peut perturber la mitose et aboutir à des fuseaux mitotiques possédant plus de 2 pôles, conduisant à une mauvaise ségrégation de l'ADN.

Les cellules cancéreuses peuvent subir une amplification centrosomale suite à diverses mutations dans leur génome. Malgré tout, ces cellules disposent de plusieurs moyens de contourner ce problème (Godinho et al., 2009) (**figure 43**). Il a été montré que certaines sont capables de regrouper leurs centrosomes surnuméraires en seulement 2 pôles au cours de la mitose, permettant ainsi l'établissement d'un fuseau mitotique normal. Ce phénomène est appelé « clustering » (Ring et al., 1982 ; Brinkley et al., 2001 ; Nigg, 2002).

Il a également été montré que la Tankyrase-1 est nécessaire à ce mécanisme (Kwon et al., 2008), de même que NuMA (Quintyne et al., 2005).

Connaissant le rôle régulateur PARP-3 vis-à-vis de l'activité de la Tankyrase-1 et de l'ADP-ribosylation de NuMA, nous nous sommes demandés si elle pouvait également avoir une fonction dans le mécanisme de « clustering ».

Pourtant l'analyse de nos lames ne montre aucune perturbation de ce processus après déplétion de PARP-3 dans les cellules HS 578T et MDA-MB 436 (résultats non montrés).

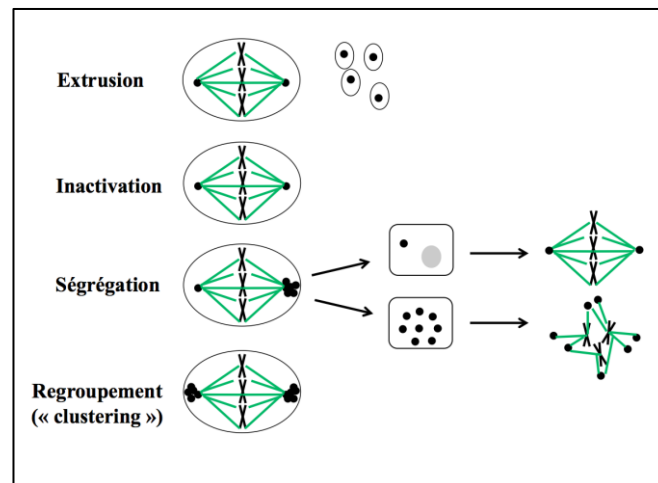


Figure 43 : Représentation schématique des différents mécanismes utilisés par les cellules cancéreuses pour contrôler l'amplification centrosomale :

- Extrusion : les centrosomes surnuméraires sont expulsés de la cellule dans des vésicules.
- Inactivation : l'activité des centres organisateurs de microtubules surnuméraires est inhibée.
- Ségrégation : un pôle mitotique est parfaitement normal, tandis que l'autre regroupe tous les centrosomes restants. Ce mécanisme peut poser problème pour l'une des 2 cellules filles si cette dernière ne parvient pas à gérer les centrosomes surnuméraires hérités.
- Regroupement ou « clustering » : mécanisme présenté ci-dessus au cours duquel les centrosomes sont groupés en 2 pôles aboutissant à la formation d'un fuseau parfaitement fonctionnel.

2.5. La déplétion de PARP-3 induit une augmentation du nombre de cellules polynucléées dans les lignées tumorales Basales B :

Une amplification centrosomale peut conduire à des aberrations mitotiques, une mauvaise ségrégation des chromosomes aboutissant à une cytotélière défectueuse et à des cellules filles polynucléées anormales.

Nous avons énuméré les cellules polynucléées, visualisées par marquage de l'ADN au DAPI, dans les cellules tumorales MDA-MB 231, HS 578T (BRCA1 non muté) et MDA-MB 436 (BRCA1 muté) après déplétion de PARP-3 (siPARP-3) ou non déplétées (scr) (**figure 44**).

Nous avons pu mettre en évidence une augmentation importante du nombre de cellules polynucléées, dans les populations de cellules déplétées en PARP-3. Cette augmentation a lieu de manière équivalente dans les 3 lignées, mutées ou non pour BRCA1.

Ce résultat est en accord avec un rôle de PARP-3 dans l'amplification centrosomale et dans la progression mitotique.

2.6. La déplétion de PARP-3 promeut la génération de micronoyaux dans la lignée cancéreuse Basale B mutée en BRCA1 :

En parallèle à l'analyse des cellules polynucléées, nous avons également énuméré le nombre de cellules présentant des micronoyaux après déplétion de PARP-3 par rapport aux cellules non déplétées. Ce nombre reste stable après déplétion de PARP-3 dans les lignées non mutées en BRCA1, MDA-MB 231 et HS 578T. En revanche, nous avons constaté une augmentation significative du nombre de cellules présentant des micronoyaux en absence de PARP-3 dans les MDA-MB 436, mutées en BRCA1 (**figure 45**).

L'origine des micronoyaux n'est pas encore totalement cernée actuellement. Il est toutefois admis que les micronoyaux sont générés au cours de la division cellulaire suite à la présence de DSB non réparées et/ou d'anomalies de fonctionnement de l'appareil mitotique. Ils sont le signe d'une instabilité génomique et peuvent aboutir à la perte de matériel génétique (Iarmarcovai et al., 2007).

En raison des rôles décrits de BRCA1 et PARP-3 dans la réparation des DSB par les processus du RH et du NHEJ respectivement, on peut formuler l'hypothèse que l'augmentation du nombre de cellules présentant des micronoyaux en absence de PARP-3

dans des cellules mutées en BRCA1 pourrait être liée essentiellement à un défaut de réparation des DSB.

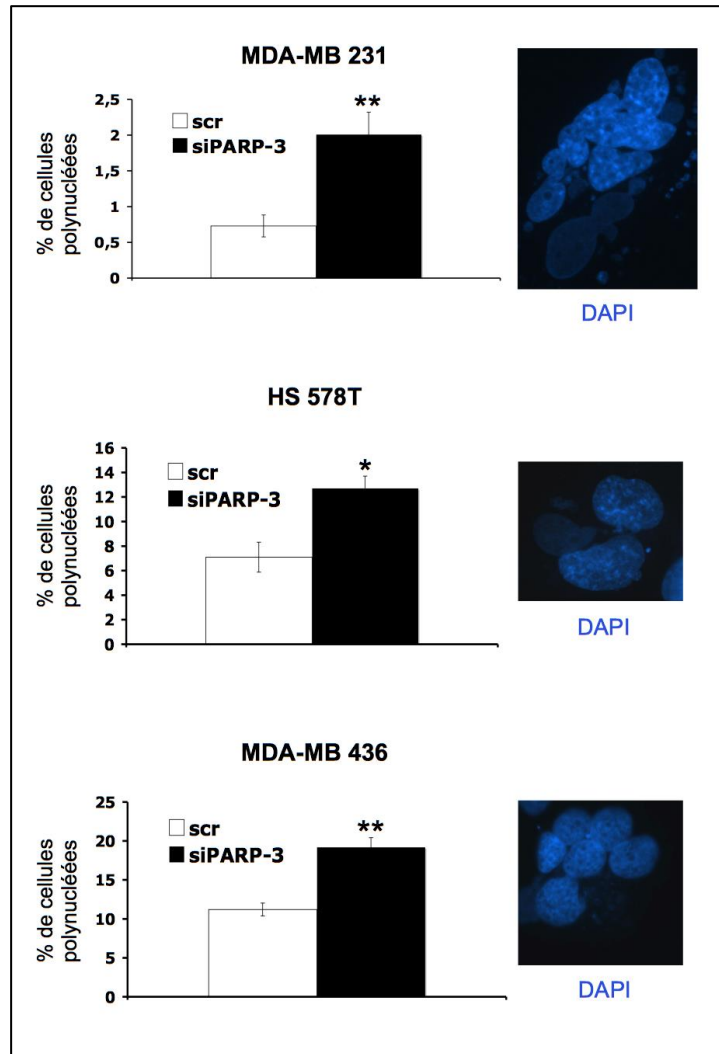


Figure 44 : La déplétion de PARP-3 induit une augmentation du nombre de cellules polynucléées :

A gauche, graphique présentant le pourcentage de cellules polynucléées dans les lignées cancéreuses MDA-MB 231, HS 578T et MDA-MB 436 en condition contrôle (scr) ou en absence de PARP-3 (siPARP-3).

* P<0,05 ;** P<0,01

A droite, image d'immunofluorescence représentative des cellules polynucléées dans chacune des lignées cellulaires. Une moyenne de 500 cellules a été comptée par condition et par expérience. Les expériences ont été réalisées 3 fois, donnant des résultats similaires.

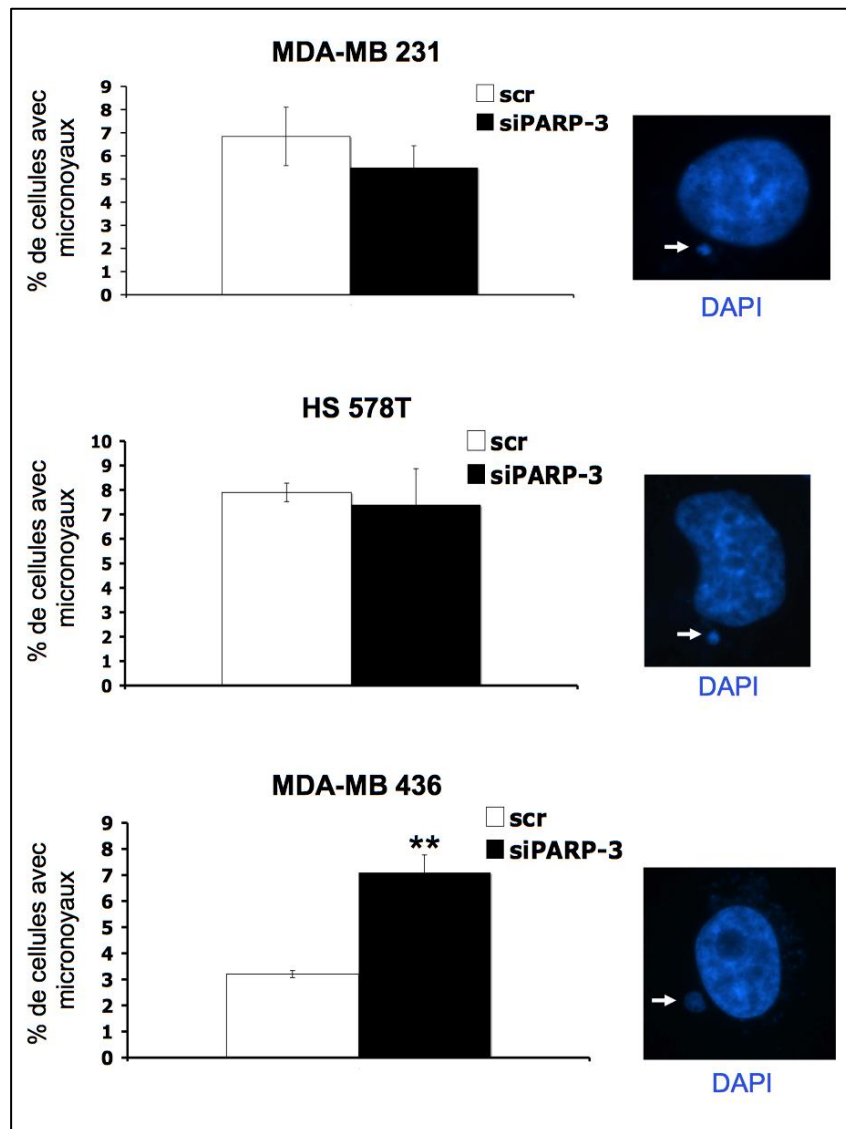


Figure 45 : La déplétion de PARP-3 induit une augmentation du nombre de cellules présentant des micronoyaux dans les lignées cancéreuses mutées en BRCA1 :

A gauche, graphique présentant le pourcentage de cellules ayant des micronoyaux dans les lignées cancéreuses MDA-MB 231, HS 578T et MDA-MB 436 en condition contrôle (scr) ou en absence de PARP-3 (siPARP-3).

** P<0,01

A droite, image d'immunofluorescence représentative de la génération de micronoyaux (indiqués par une flèche blanche) dans chacune des lignées cellulaires. Une moyenne de 500 cellules a été comptée par condition et par expérience. Les expériences ont été réalisées 3 fois, donnant des résultats similaires.

3. Discussion et perspectives :

3.1. Des études préliminaires prometteuses basées sur le principe de létalité synthétique :

L'étude de PARP-3 dans les cellules tumorales n'en est qu'à ses débuts. Les premiers résultats que nous avons obtenus lors de notre investigation de la fonction de PARP-3 dans les lignées cancéreuses du sein s'avèrent intéressants et prometteurs.

L'augmentation de l'expression de PARP-3 et de la Tankyrase-1 avec l'agressivité des lignées étudiées est intéressante et met en évidence un rôle important de cette protéine dans le processus de tumorigénèse, voire dans l'invasion métastatique. Des études explorant cette question sont actuellement en cours dans le laboratoire. De plus cette observation permet d'envisager un bénéfice thérapeutique dans l'inactivation de PARP-3 en tumorigénèse. Ce raisonnement s'applique également à la Tankyrase-1.

De plus, ce résultat est en accord avec l'étude de Hudelist et al. qui montre que les cellules cancéreuses du sein peuvent voir l'expression de leurs protéines modifiée par rapport aux cellules normales (Hudelist et al., 2004), il semblerait donc que l'expression de PARP-3 soit également perturbée lors de la tumorigénèse.

Nous avons observé une forte augmentation de la létalité dans des cellules tumorales Basales B mutées en BRCA1 après déplétion de PARP-3.

PARP-3 est impliquée dans deux mécanismes essentiels à la survie de la cellule : réparation de l'ADN et mitose. La déplétion de PARP-3 aura un impact aussi bien sur l'une que sur l'autre. Il est donc difficile de conclure quel mécanisme est majoritairement perturbé suite à l'absence de PARP-3 pour induire l'augmentation de la létalité dans les cellules mutées en BRCA1. De même, la mutation/absence de BRCA1 ne permet pas de répondre à cette question car cette protéine est également impliquée à la fois dans la réparation des DSB et les processus mitotiques via l'amplification centrosomale.

Le ciblage de RAD51 pouvait nous aider à répondre à cette problématique car cette protéine est, jusqu'à présent, décrite comme intervenant uniquement dans le HR. Mais la forte toxicité de sa simple déplétion complique son utilisation, d'autant que la double déplétion PARP-3/RAD51 réduit de 90% la viabilité de manière spontanée. L'application d'un traitement génotoxique en vue de générer des DSB est difficilement envisageable dans ce cas car il est à prévoir que la totalité des cellules soit éliminée.

Avant de valider l'hypothèse d'un ciblage simultanée du HR et du NHEJ, il sera donc nécessaire de poursuivre ce travail en étudiant l'impact d'une double déplétion de PARP-3 avec d'autres protéines du HR telles que RAD54 ou BRCA2.

Afin de compléter notre approche, nous procédons actuellement à des tests de survie par clonogénicité après déplétion de PARP-3 dans d'autres lignées cancéreuses mammaires et d'ovaires mutées en BRCA1.

3.2. PARP-3 et Tankyrase-1 : une implication commune dans l'amplification centrosomale ?

L'implication de PARP-3 dans les mécanismes d'amplification centrosomale est une observation intéressante, d'autant qu'une étude a montré que la déplétion de la Tankyrase-1 induit un phénotype similaire. De la même manière, cette amplification est encore accrue en absence de BRCA1 (McCabe et al., 2009).

Nous avons pu montrer que PARP-3 et la Tankyrase-1 interagissent et que la première régule l'activité de la seconde. Nos études et celles de McCabe et al. montrent qu'il est possible d'aboutir à une amplification centrosomale en déplaçant soit PARP-3 soit la Tankyrase-1.

Il serait intéressant de réaliser une double déplétion de PARP-3 et de la Tankyrase-1 dans les lignées HS 578T et MDA-MB 436 et de procéder à l'évaluation du nombre de centrioles présents par cellule. Ceci permettra de vérifier si les effets des déplétions de PARP-3 et Tankyrase-1 sont additifs ou pas et donc si PARP-3 et la Tankyrase-1 interviennent ou non dans le même mécanisme cellulaire d'amplification centrosomale.

3.3. Mise en perspective :

Il est nécessaire de garder à l'esprit que les lignées tumorales que nous avons utilisées ont des transcriptomes pouvant être très variés. Nous nous sommes focalisés sur le statut muté ou non de BRCA1, mais il est évident que d'autres gènes sont susceptibles d'être mutés et sujets à une sous- ou une sur-expression. Nous avons tenté de contourner cette difficulté en effectuant une déplétion de BRCA1 dans des cellules de type Basale B et nous avons retrouvé une létalité cellulaire augmentée quand PARP-3 est également déplétée, mais la disparité

initiale de phénotype entre lignées peut poser problème pour émettre des conclusions précises sur le plan fonctionnel.

Nous avons évalué l'effet de la déplétion de PARP-3 sur des cellules cancéreuses. Afin de valider ces résultats, il est important d'effectuer les mêmes tests sur des cellules mammaires normales (MCF10A par exemple) pour juger de la toxicité du traitement par les siRNA spécifique de la PARP-3 dans une cellule normale par rapport à une cellule cancéreuse. L'impact de la déplétion spécifique de PARP-3 devra également être confirmé par l'analyse du phénotype obtenu après réexpression de PARP-3.

D'autre part, nos études demeurent des analyses effectuées sur des cultures cellulaires maintenues dans un milieu de culture qui demeure un environnement artificiel ne mimant pas la complexité de l'environnement réel d'une tumeur dans un organisme. C'est pourquoi il serait également intéressant d'utiliser un modèle de xénogreffe sur des souris « nude » en injectant des cellules cancéreuses (MDA-MB 231 et MDA-MB 436) de manière sous-cutanée. Ceci afin d'obtenir la formation *in vivo* d'une tumeur facilement mesurable en surface et s'étant développé dans des conditions physiologiques normales. Il est possible d'utiliser des cellules cancéreuses déficientes ou non en HR dans cette approche. Une injection intra-tumorale d'ARN interférents dirigés contre PARP-3 peut être réalisée, et l'impact potentiel de cette déplétion sur la croissance tumorale et sur les structures histologiques pourra être mesuré. Alternativement, il est possible d'établir des lignées MDA-MB 231 et MDA-MB 436 avec une déplétion constitutive ou inductible de PARP-3.

4. Conclusion :

Nos premiers résultats ont montré un effet délétère de la déplétion de PARP-3 dans des lignées cancéreuses de sein humain mutées en BRCA1. Cet effet peut s'expliquer en partie par une amplification centrosomale aberrante conduisant à des anomalies mitotiques. L'impact de la déplétion de PARP-3 sur la survie cellulaire peut être potentialisé par un traitement avec un agent génotoxique générateur de DSB.

Des études complémentaires sont encore à réaliser mais PARP-3 pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante dans les cancers du sein/ovaires mutés pour BRCA1 ou

déficients dans la réparation par le HR. Il serait donc avantageux de développer des études de criblage de chimiothèques afin d'identifier des inhibiteurs spécifiques de la PARP-3. L'ensemble de nos résultats devra alors être confirmé après traitement avec l'inhibiteur PARP-3 ainsi identifié.

Conclusion générale

A. PARP-3, une enzyme aux multiples facettes enfin mieux cernée :

Il était admis que la réaction de poly(ADP-ribosyl)ation était impliquée dans les mécanismes de signalisation et de réparation des cassures dans l'ADN. Les études récentes sur les PARPs montrent que ces protéines ont des rôles cellulaires dont le nombre ne cesse de croître. Elles sont désormais connues pour être impliquées dans la réparation de différentes lésions (simple- ou double-brin) dans l'ADN mais également dans la régulation de la transcription, la réplication, la surveillance de l'intégrité des télomères, la division cellulaire et même la mort cellulaire.

PARP-3 n'était jusqu'alors pas la PARP la plus étudiée de sa famille, et sa « visibilité » était donc des plus réduites. Nos travaux ont permis de dégager des rôles fonctionnels de PARP-3.

1. Un nouvel acteur des mécanismes de réparation de l'ADN :

PARP-3 possède de nombreuses similitudes structurales avec PARP-1 et PARP-2, deux enzymes impliquées dans la réponse cellulaire aux dommages et plus particulièrement dans la réparation des SSB. De plus, il n'a été possible de détecter *in vitro* une activité enzymatique de PARP-3 qu'en présence d'ADN. Il n'y avait donc qu'un pas pour imaginer que PARP-3 puisse être impliquée également dans des mécanismes de surveillance de l'intégrité du génome. Il s'avère que cette enzyme intervient spécifiquement dans la réparation des DSB, vraisemblablement à travers les deux voies existantes du NHEJ. Ses interventions temporelle et spatiale précises dans ces mécanismes restent toutefois à déterminer.

2. Membre et régulateur d'un complexe protéique impliqué dans les phénomènes mitotiques :

La recherche de nouveaux partenaires de PARP-3 nous a permis de mettre au jour l'existence d'un complexe protéique formé de PARP-3, de la Tankyrase-1 et de la protéine NuMA. Au sein de ce complexe, PARP-3 a un véritable rôle clé de régulateur de l'activité

d'une autre PARP, la Tankyrase-1, et par conséquent du degré d'hétéromodification de NuMA. Ce rôle régulateur était insoupçonné et prouvait que PARP-3 méritait une attention importante.

Nous avons également pu montrer que PARP-3 joue un rôle essentiel dans la progression mitotique, résultat tout à fait en accord avec son association avec deux protéines nécessaires au bon déroulement de la mitose.

Enfin, l'implication de PARP-3 dans l'intégrité télomérique semble, quant à elle, faire le lien entre son interaction avec la Tankyrase-1, « surveillante » des télomères, et son rôle dans le NHEJ.

Nous n'avons sans doute pas défini toutes les fonctions cellulaires existantes de PARP-3 car celle-ci apparaît aujourd'hui comme une enzyme à plusieurs facettes, un peu à l'instar de ses grandes sœurs PARP-1 et PARP-2. Un simple exemple est son interaction avec les protéines PcG. Il n'est pas à exclure une intervention croisée de PARP-3 avec ces régulateurs transcriptionnels. En effet, PARP-3 est actrice des mécanismes de réparation de l'ADN et des études montrent qu'il pourrait en être de même pour certains membres des PcG. Inversement, ces protéines interviennent dans la régulation de la transcription, tandis que PARP-3 pourrait avoir également un rôle dans ce processus.

Cette enzyme a sans doute encore beaucoup de secrets à révéler, ce qui fait d'elle un terrain d'investigation plus que jamais ouvert.

B. Caractérisation fonctionnelle de PARP-3 : et maintenant ?

Grâce à nos recherches et celles d'autres équipes scientifiques, PARP-3 est désormais mieux caractérisée. Toutefois, de très nombreuses zones d'ombre subsistent encore.

1. Caractérisation structurale :

La structure modulaire de PARP-3 a été globalement résolue, mais ce n'est pas le cas des fonctions mêmes des différents domaines.

Il a été montré que les domaines en doigt de Zinc 1 et 3 de PARP-1 forment avec son domaine WGR une interface avec l'ADN (Langelier et al., 2012). Ceci peut expliquer le fait que PARP-1 est inactive en absence du domaine WGR (Altmeyer et al., 2009). PARP-3 possédant également un domaine WGR et ayant tout comme PARP-1 une activité dépendante de la présence d'ADN, il se pourrait que ce domaine soit également nécessaire à l'activité enzymatique de PARP-3, mais cela reste à démontrer.

L'extension N-terminal de l'isoforme longue de la PARP-3 est suffisante pour permettre sa localisation au niveau du centrosome. Pour autant, cette extension interagit-elle directement avec le centriole fille et/ou avec un élément du matériel péricentriolaire ? En effet, ce matériel est riche d'éléments différents parmi lesquels divers ARN (Pepper and Brinkley, 1980 ; Pederson, 2006) et des protéines de structure et de nucléation des microtubules (péricentrine, ninéine, γ -tubuline,...). La principale difficulté d'une telle investigation est que les composants du matériel péricentriolaire ne sont pas tous connus et que la fonction exacte de plusieurs d'entre eux n'est pas élucidée.

Une autre interrogation annexe serait de savoir quel homologue protéique existe chez la souris pour compenser l'absence de l'isoforme longue de PARP-3. Les mêmes difficultés se présenteraient pour répondre à cette question.

2. PARP-3 pourrait interagir avec encore d'autres protéines :

La liste des partenaires protéiques de PARP-3 identifiés à ce jour n'est sans doute pas exhaustive.

En effet, outre NuMA, nous avons pu identifier un autre nouveau partenaire de PARP-3, la Wolframine. Codée par le gène WFS1 (WolFram Syndrome 1), cette protéine est localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique et y aurait un rôle à la fois dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées et dans la maintenance du réticulum en régulant les niveaux de calcium qu'il contient. En outre, la Wolframine pourrait aider à transformer la proinsuline en insuline dans les cellules pancréatiques (Takei et al., 2006).

Il est intrigant que PARP-3 ait une interaction avec une telle protéine. Il serait bien trop hasardeux d'émettre une quelconque théorie sur le rôle possible de cette interaction sans

aucune expérience préalable, mais elle illustre bien le fait que PARP-3 sera certainement encore une source de découvertes intéressantes dans un futur proche.

C. PARP-3, une cible potentielle en thérapie du cancer du sein :

Toute recherche fondamentale a pour objectif de fournir des résultats et des connaissances pouvant un jour être susceptibles d'être utilisés sur un terrain de recherche plus appliqué. Ceci est d'autant plus vrai en biologie où l'entreprise de recherche a pour but d'aboutir au développement de thérapies nouvelles.

Notre approche expérimentale fut fort simple et consistait à tirer profit de l'implication de PARP-3 dans deux phénomènes cellulaires fondamentaux pour la survie de la cellule : la réparation des DSB et la division cellulaire.

Il avait été établi que des cellules cancéreuses de l'ovaire et du sein humains étaient susceptibles d'être mutées pour BRCA1 et donc dépourvues de HR fonctionnel. Nous basant sur le principe de la létalité synthétique, nous avons voulu savoir si le ciblage de PARP-3 pouvait avoir un impact sur de telles cellules, et surtout sur les cellules cancéreuses Triple Négatives, car décrites comme les plus susceptibles de résister aux thérapies existantes.

Nos résultats préliminaires sur ce sujet sont très encourageants car la simple déplétion de PARP-3 dans des cellules cancéreuses déficientes en HR promeut une létalité excessivement forte. Cette létalité pourrait s'expliquer aussi bien par l'altération quasi complète des mécanismes de réparation des DSB que par la forte perturbation des phénomènes mitotiques dans de telles cellules (**figure 46**).

L'utilisation d'ARN interférents ciblant PARP-3 serait théoriquement applicable en thérapie humaine. En effet, il a été montré que l'utilisation de petits ARN double-brin pouvait initier les mécanismes d'ARN interférence dans des cellules de mammifères, sans pour autant déclencher une réaction immunitaire indésirable (Elbashir et al., 2001). Une autre étude montre qu'il est possible de traiter des tumeurs solides humaines par une approche utilisant des ARN interférents (Davis et al., 2010).

Si l'utilisation de l'interférence ARN apparaît comme une alternative thérapeutique tout à fait prometteuse et viable, sa principale limitation reste la même que pour tout autre type de

traitement anticancéreux : le ciblage précis de l'ARNm codant la molécule d'intérêt dans les cellules cancéreuses et non dans les cellules saines. L'injection intratumorale de telles molécules pourrait éventuellement aider à contourner cette difficulté.

Nous ne sommes qu'au tout début d'une telle investigation sur PARP-3 en tant que cible thérapeutique, d'autres approches sont à utiliser pour confirmer nos analyses. Mais nous espérons que de tels résultats inciteront la communauté scientifique à s'intéresser au développement d'un inhibiteur spécifique de PARP-3, dans le but d'une thérapie ciblant très précisément cette enzyme dans les cellules cancéreuses du sein humain. La génération d'un tel inhibiteur ouvrirait la voie à des études pré-cliniques passionnantes. Cette recherche semble être en bonne voie car, selon l'étude de Wahlberg et al., un composé « numéro 50 » pourrait être un inhibiteur spécifique potentiel (Wahlberg et al., 2012).

Il est évident que l'étude de PARP-3 nécessite encore de multiples recherches pour la caractériser au mieux fonctionnellement et structurellement. Cette enzyme apparaît comme avoir un grand potentiel, autant en terme de compréhension purement fondamentale du fonctionnement de différentes voies cellulaires que de développement de thérapie(s) future(s) contre le cancer.

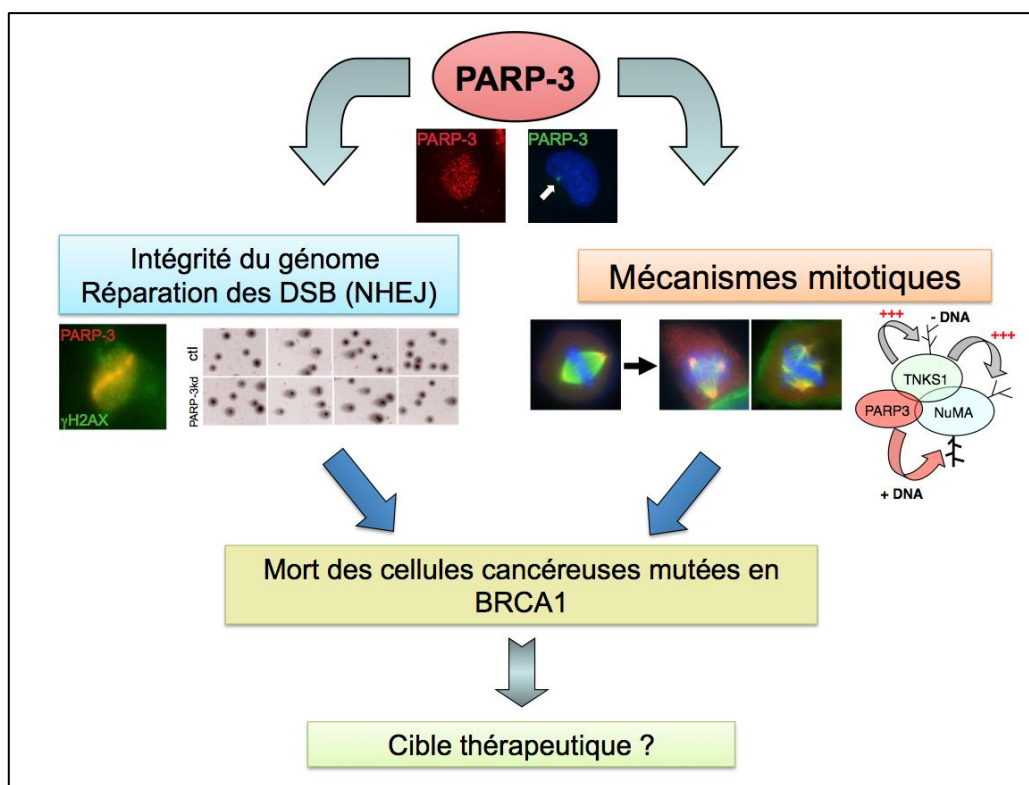


Figure 46 : Schéma récapitulatif de l'approche thérapeutique possible ciblant PARP-3

Publication n°2 :

PARP-3, a DNA-dependent PARP with emerging roles in double-strand break repair and mitotic progression

Christian Boehler and Françoise Dantzer.

Annexe : Description des différentes phases d'essais cliniques :

Tout composé chimique à visée thérapeutique passe par un ensemble d'analyses cliniques regroupées en 4 phases distinctes.

Phase I :

En règle générale, les essais sont réalisés chez des volontaires sains. Dans certains cas, la personne volontaire peut être malgré tout malade, comme dans le cas de volontaires atteints d'un cancer.

Cette phase répond à 2 objectifs principaux :

- s'assurer que la toxicité du traitement administré chez l'homme ne dépasse pas la toxicité observée lors de tests pré-cliniques (sur des lignées cellulaires ou des animaux). Ceci afin de déterminer la dose maximale du médicament pouvant être toléré par l'organisme humain.
- analyser le devenir du médicament dans l'organisme par pharmacocinétique, ceci en fonction du mode d'administration.

Phase II :

Au cours de cette phase, le but est de déterminer la posologie adéquate et optimale du médicament. Dans le cas de drogues anti-tumorales, l'efficacité du traitement expérimental est alors testée sur différents types de cancer.

Phase III :

La phase III consiste en un ensemble de tests comparatifs durant lesquels le composé est comparé à un traitement efficace déjà commercialisé pour la même pathologie. Dans certains cas, le composé est également comparé à un placebo.

C'est au cours de cette phase qu'est évalué le rapport bénéfice/risque du traitement expérimental.

Phase IV :

Cette phase ne débute qu'une fois le médicament commercialisé. Les essais de phase IV sont effectués sur un grand nombre de personnes (allant jusqu'à plusieurs milliers) et servent à établir les effets indésirables du médicament lors de son utilisation qui n'auraient pas été détectés lors des 3 premières phases. Cette pharmacovigilance permet d'évaluer à grande échelle la tolérance des patients au traitement commercialisé.

Publication n°3 :

Phenotypic Characterization of Parp-1 and Parp-2 Deficient Mice and Cells

Christian Boehler, Laurent Gauthier, Jose Yelamos, Aurélia Noll, Valérie Schreiber, and
Françoise Dantzer.

Matériel et Méthodes

Essai COMET en conditions alcalines

Les cellules exposées ou non aux rayons X sont délicatement trypsinisées dans du PBS-1X et 5mM EDTA aux temps indiqués après irradiation. Elles sont ensuite resuspendues dans de l'agarose « Low-Melting Point » de type VII (Sigma-Aldrich) à 0,5% (2×10^5 cellules/ml) puis étalées sur des lames préalablement recouvertes d'une fine couche d'agarose 1% (UltraPure, Invitrogen).

Pour les essais COMET en conditions alcalines, les lames sont plongées dans un tampon de lyse [2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 10), 0,5% Triton X-100 and 10% DMSO] pendant 1 heure à température ambiante, puis sont lavées pendant 40 minutes dans le tampon d'électrophorèse [1mM EDTA, 300mM NaOH, 2,5M Tris-OH (pH 12,7)] à température ambiante, avant électrophorèse à 17mA, 0,8V/cm pendant 30 minutes à température ambiante. Les lames subissent ensuite 3 lavages de 5 minutes dans du tampon de lavage [0,4M Tris-HCl (pH 7,5)] à température ambiante puis sont séchées à l'air libre.

L'ADN qui a migré est coloré avec du Bromure d'Ethidium à 2 μ g/ml puis visualisé avec un microscope à épifluorescence (DMRA2, Leica Microsystems) équipé d'une caméra Hamamatsu et le logiciel OpenLab 5 (Improvision) au grossissement 20X.

Test d'efficacité du NHEJ *in vitro*

Extraits nucléaires de rates de souris

Les rates sont prélevées sur des souris sauvages ou déficientes en Parp-3. Trois rates sont utilisées pour réaliser un extrait nucléaire. Elles sont écrasées entre 2 lames, leur contenu est homogénéisé dans du PBS-1X puis centrifugé 7 minutes à 2.000 g à 4°C. Le culot est nettoyé 2 fois dans du PBS-1X puis centrifugé 5 minutes à 500 g à 4°C. Le culot est resuspendu dans

un volume de tampon hypotonique [10mM HEPES (pH 7,5), 1,5mM MgCl₂, 5mM KCl, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT] 5 fois supérieur à son propre volume, puis laissé 10 minutes sur glace et centrifugé 10 minutes à 1.200 g à 4°C. Le culot est repris dans un volume de tampon hypotonique égal au sien puis broyé avec un pilon. Du KCl 3M est ajouté doucement afin d'avoir une concentration finale de 50mM KCl. La solution est gardée sur glace 10 minutes puis centrifugée 20 minutes à 3.000 g à 4°C puis le surnageant est retiré.

Le culot est repris dans un volume de tampon « Low salt » [20mM HEPES (pH 7,9), 1,5mM MgCl₂, 20mM KCl, 0,2mM EDTA, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT] 2 fois supérieur à son propre volume, puis un volume de tampon « High salt » [10mM HEPES (pH 7,5), 1,5 mM MgCl₂, 1,6M KCl] égal au volume initial du culot est ajouté doucement. La solution est agitée doucement à 4°C pendant 30 minutes, puis centrifugée 30 minutes à 40.000 g à 4°C. Le surnageant est dialysé une nuit dans un sac de dialyse 10-14kDa contre 50-100 volumes de tampon de dialyse [20mM HEPES (pH 7,9), 10% glycérol, 100mM KCl, 0,2mM EDTA, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT]. Le lendemain la solution est centrifugée 20 minutes à 10.000 g pour retirer les protéines précipitées et le surnageant constitue l'extrait nucléaire. Sa concentration en protéines totale est quantifiée par un test de Bradford (BIO-RAD) au spectrophotomètre à une DO (Densité Optique) de 595 nm.

Digestion du plasmide substrat de réparation

Le plasmide puc8 est digéré par les enzymes de restriction EcoR1 ou Sma1 (New England BioLabs) à raison de 2U d'enzyme/μg d'ADN. Enzyme et ADN sont incubés à la température appropriée (25°C pour Sma1 et 37°C pour EcoR1) et avec le tampon d'activité NE4 pendant 2 heures. Le plasmide est ensuite purifié à l'aide du kit NucleoSpin Extract II® (Macherey-Nagel) et sa digestion vérifiée sur gel d'agarose 1% (UltraPure, Invitrogen) contenant du Bromure d'Ethidium à 250ng/ml après électrophorèse à 5V/cm pendant 1 heure à température ambiante. Sa concentration est déterminée à l'aide du système Nanovue Plus (GE Healthcare).

Test d'efficacité de ligation *in vitro*

La réaction de ligation se fait dans un volume total de 20μl : 2μl de tampon NHEJ [200mM HEPES-KOH (pH 7,5), 800mM KCl, 100mM MgCl₂], 1μl de solution d'ATP 20mM, 1μl de DTT 20mM, 50-250ng d'ADN substrat, 1-10μg d'extrait nucléaire, qsp eau MilliQ® stérile]. La solution est incubée 1 heure à 25°C.

La réaction de ligation est stoppée en ajoutant 2µl de 0,5% SDS, 2µl de 0,5M EDTA et 1µl de Protéinase K de solution stock à 10mg/ml (Sigma-Aldrich). La solution est incubée 30 minutes à 37°C, puis 4µl de tampon de charge et 1µl de Syto60 (Li-Cor Biosciences) y sont ajoutés. L'échantillon est laissé 5 minutes à température ambiante avant dépôt dans un gel d'agarose 0,7% (UltraPure, Invitrogen) et électrophorèse à 5V/cm pendant 1 heure à température ambiante.

La prise d'image du gel et la quantification du signal ont été effectuées avec un système Odyssey Infrared Imaging (Li-Cor Biosciences).

Lignées et cultures cellulaires

Les lignées MRC5 ctl et PARP-3^{kd} sont cultivées dans du milieu DMEM à 1g/L de D-glucose, L-Glutamine et Sodium Pyruvate (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO, Invitrogen) supplémenté de 20% (v/v) de sérum de veau fœtal (Pan Biotech) et de 50µg/mL de gentamycine (Invitrogen). La sélection est maintenue par l'ajout d'hygromycine B à 200µg/ml.

La lignée HeLa est cultivée dans du milieu DMEM à 1g/L de D-glucose, L-Glutamine et Sodium Pyruvate (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO, Invitrogen) supplémenté de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (Pan Biotech) et de 50µg/mL de gentamycine (Invitrogen).

Les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB 231, MDA-MB 436 et MDA-MB 468 sont cultivées dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), L-Glutamine (GIBCO, Invitrogen) supplémenté de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (Pan Biotech) et de 50µg/mL de gentamycine (Invitrogen). Les lignées cancéreuses mammaires HS 578T, HCC 1937 et MCF7 sont cultivées dans du milieu DMEM à 1g/L de D-glucose, L-Glutamine et Sodium Pyruvate (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO, Invitrogen) supplémenté de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (Pan Biotech) et de 50µg/mL de gentamycine (Invitrogen). Toutes les lignées sont maintenues à 37°C, en atmosphère humide contenant 5% de CO₂ et sont trypsinisées pour maintenance ou expérimentation à semi-confluence (80-90%).

Déplétions transitoires par ARN interférence

Les lignées MRC5 ctl et PARP-3^{kd}, MDA-MB 231, MDA-MB 436 et HS 578T sont transfectées avec 50nM de siRNA (ON-TARGET *plus* siRNA, Dharmacon) en utilisant l'agent de transfection jetPRIME™ (Polyplus-transfection) et en suivant le protocole établi par le fournisseur. Un mélange contenant le tampon jetPRIME™, le réactif jetPRIME™ ainsi que les siRNA est incubé pendant 15 minutes à température ambiante, puis déposé goutte à goutte sur les cellules adhérentes.

Tests de survie cellulaire par clonogénicité

Le protocole utilisé est équivalent à celui décrit dans (Boehler et al., 2011).

Les expériences montrées sont représentatives d'au moins 3 expériences effectuées en triplicata et ayant donné le même résultat. Les analyses statistiques indiquées par les valeurs p ont été réalisées en appliquant le test Anova et en utilisant le logiciel StatView.

Western Blot

Le protocole utilisé est équivalent à celui décrit dans (Boehler et al., 2011).

Les anticorps primaires utilisés en Western Blot sont :

- l'anticorps polyclonal de lapin anti-PARP-3 (4698) à 1:10.000
- l'anticorps monoclonal de souris anti-RAD51 (ab-1837) (Abcam) à 1:500
- l'anticorps polyclonal de lapin anti-actine (Sigma-Aldrich) à 1:500.
- l'anticorps polyclonal de chèvre anti-XRCC1 (D-18) (Santa Cruz Biotechnology) à 1:5.000
- l'anticorps polyclonal de lapin anti-Tankyrase1 (465) à 1:1.000
- l'anticorps polyclonal de lapin anti-RPA32 (ab2626) (Abcam) à 1:2.500
- l'anticorps polyclonal de lapin anti-phosphoRPA32 (S4/S8) (Bethyl Laboratories) à 1:1.000
- l'anticorps monoclonal de souris anti-DNA-PKcs (Ab-4) (Interchim) à 1:200
- l'anticorps monoclonal de souris anti-phosphoDNA-PKcs (phosphoT2609) mouse (ab18356) (Abcam) 1:500
- l'anticorps monoclonal de souris anti-CHEK1 (G-4) (sc-8408) (Santa Cruz Biotechnology) à 1:200

-l'anticorps polyclonal de lapin anti-phosphoCHK1 (#2348) (Ser345) (Cell Signaling) à 1:1.000

Immunofluorescence

Le protocole utilisé est équivalent à celui décrit dans (Boehler et al., 2011).

Les expériences montrées sont représentatives de 3 expériences effectuées en triplicata et ayant donné le même résultat. Les analyses statistiques indiquées par les valeurs p ont été réalisées en appliquant le test Anova et en utilisant le logiciel StatView.

Les anticorps primaires utilisés en immunofluorescence sont :

- l'anticorps monoclonal de souris anti-p34cdc2 (Santa Cruz Biotechnology) à 1:500
- l'anticorps monoclonal de souris anti- γ H2AX (Upstate) à 1:500
- l'anticorps monoclonal de souris anti-RAD54 (ab11055) (Abcam) à 1:200
- l'anticorps polyclonal de lapin anti-PARP-3 (4698) à 1:200
- l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TRF2 (N-20) (Santa Cruz Biotechnology) à 1:100

Les anticorps secondaires utilisés en Western Blot sont :

- l'anticorps de mouton anti-IgG2 α de souris couplé à l'Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) à 1:1500
- l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à l'Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) à 1:1500
- l'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa Fluor® 594 (Invitrogen) à 1:1500
- l'anticorps d'âne anti-IgG de chèvre couplé à l'Alexa Fluor® 594 (Invitrogen) à 1:1500
- l'anticorps de rat anti-IgG de souris couplé à l'Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) à 1:1500

Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative

Extraction d'ARN

L'ARN des cellules MDA-MB 231 et HS 578T transfectées est extrait suivant la méthode du Trizol® (330 μ l par puits d'une plaque 6 puits et 1ml par boîte de Petri de 100mm). La

quantité d'ARN extraite est mesurée à l'aide du système NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare).

Traitement aux DNases et purification d'ARN

Les échantillons d'ARN sont traités à la DNase afin d'éliminer l'ADN génomique. Pour cela, un mélange est réalisé contenant : 1 à 8 µl d'ARN (2µg), 2µl de tampon RQ1 RNase-Free DNase 10X (Promega), 2µl de RQ1 RNase-Free DNase à 1U/µg d'ARN (Promega) et de l'eau MilliQ® stérile en quantité suffisante pour 20µl. La solution est chauffée à 37°C pendant 30 minutes. Puis 2µl de RQ1 DNase Stop Solution (Promega) est ajouté au mélange et la solution est chauffée à 65°C pendant 10 minutes pour inactiver la DNase.

L'ARN est ensuite purifié pour éliminer la DNase grâce au kit Nucleospin® RNA Clean-up XS (Macherey-Nagel) puis quantifié à l'aide du système NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare).

RT-PCR quantitative (RT-qPCR)

L'ARN total extrait et purifié (2µg) est utilisé pour former de l'ADN complémentaire (ADNc) pour la PCR quantitative suivant le protocole de l'AMV Reverse Transcriptase® (Finnzymes). L'ARN (1µg) est chauffé à 72°C pendant 10 minutes en présence de 1,6µl d'OligodT à 0,5µg/µl (Sigma Aldrich) puis les échantillons sont mis directement sur glace pour permettre une bonne hybridation. Puis, l'eau MilliQ® stérile en quantité suffisante pour 20µl est ajouté au mix de réaction, ainsi que 2µl de dNTPs à 10mM, 2µl de tampon RT 10X [(250mM Tris-HCl (pH 8,3), 5mM MgCl₂, 500mM KCl, 20mM DTT), Finnzymes], 1µl de RNase OUT à 1U/µl (Finnzymes) et enfin 0,5µl d'AMV RT à 1U/µl (Finnzymes). Le tout est chauffé à 42°C pendant 40 minutes.

Pour la PCR quantitative, un mix réactionnel de 20µl est réalisé selon le protocole QuantiTect® SYBR® Green PCR (QIAGEN) : 10µl de SYBR Green PCR Master Mix 2X (QIAGEN), 2µl des Primers Mix à 5µM spécifiques des gènes étudiés (**Tableau 4**) : PARP-3, BRCA1, GAPDH (Thermo Scientific), 6µl d'eau MilliQ® stérile et 2µl d'ADNc dilué au 5^{ème} dans de l'eau MilliQ® stérile. La PCR se déroule pendant 40 cycles à 95°C pendant 15 secondes (dénaturation), 60°C pendant 20 secondes (hybridation) et 72°C pendant 20 secondes (extension). La quantité des produits de PCR est estimée selon la méthode de quantification par les courbes de standard. La courbe de fusion (melting curve) permet de contrôler la qualité des produits de PCR. Tous les échantillons sont analysés en triplicatas et

les résultats sont normalisés selon le gène de la GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate déhydrogénase). Les résultats sont obtenus grâce à l'appareil de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ et analysés avec le logiciel StepOne™ Software v2.1.

Nom de l'oligonucléotide	Séquences (5'-3')
PARP-3 → F	TGGCAAGGGCATCTACTTTG
PARP-3 → R	TCCGTGTTGATATGGTGCTC
BRCA1 → F	ACAAGCGTCTCTGAAGACTG
BRCA1 → R	AGTTCAGCCATTTCTGCTG
GAPDH → F	ATGTTTCGTCATGGGTGTGAA
GAPDH → R	GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT

Tableau 4 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour la RT-qPCR

F : Forward ; R : Reverse.

Bibliographie

-A-

- Aguiar, R.C., Takeyama, K., He, C., Kreinbrink, K., and Shipp, M.A. (2005). B-aggressive lymphoma family proteins have unique domains that modulate transcription and exhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity. *J Biol Chem* 280, 33756-33765.
- Aguiar, R.C., Yakushijin, Y., Kharbanda, S., Salgia, R., Fletcher, J.A., and Shipp, M.A. (2000). BAL is a novel risk-related gene in diffuse large B-cell lymphomas that enhances cellular migration. *Blood* 96, 4328-4334.
- Ahel, D., Horejsi, Z., Wiechens, N., Polo, S.E., Garcia-Wilson, E., Ahel, I., Flynn, H., Skehel, M., West, S.C., Jackson, S.P., *et al.* (2009). Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science* 325, 1240-1243.
- Ahel, I., Ahel, D., Matsusaka, T., Clark, A.J., Pines, J., Boulton, S.J., and West, S.C. (2008). Poly(ADP-ribose)-binding zinc finger motifs in DNA repair/checkpoint proteins. *Nature* 451, 81-85.
- Ali, A.A., Timinszky, G., Arribas-Bosacoma, R., Kozlowski, M., Hassa, P.O., Hassler, M., Ladurner, A.G., Pearl, L.H., and Oliver, A.W. (2012). The zinc-finger domains of PARP1 cooperate to recognize DNA strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* 19, 685-692.
- Almeida, K.H., and Sobol, R.W. (2007). A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)* 6, 695-711.
- Altmeyer, M., Messner, S., Hassa, P.O., Fey, M., and Hottiger, M.O. (2009). Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res* 37, 3723-3738.
- Aly, A., and Ganesan, S. (2011). BRCA1, PARP, and 53BP1: conditional synthetic lethality and synthetic viability. *J Mol Cell Biol* 3, 66-74.
- Ame, J.C., Fouquerel, E., Gauthier, L.R., Biard, D., Boussin, F.D., Dantzer, F., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2009). Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells. *J Cell Sci* 122, 1990-2002.
- Ame, J.C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Hoger, T., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1999). PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 274, 17860-17868.
- Ame, J.C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* 26, 882-893.
- Anders, C., and Carey, L.A. (2008). Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 22, 1233-1239; discussion 1239-1240, 1243.
- Aravind, L. (2001). The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. *Trends Biochem Sci* 26, 273-275.
- Atasheva, S., Akhrymuk, M., Frolova, E.I., and Frolov, I. (2012). New PARP Gene with an Anti-Alphavirus Function. *J Virol* 86, 8147-8160.

Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* 279, 55117-55126.

Audebert, M., Salles, B., Weinfeld, M., and Calsou, P. (2006). Involvement of polynucleotide kinase in a poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway. *J Mol Biol* 356, 257-265.

Augustin, A., Spenlehauer, C., Dumond, H., Menissier-De Murcia, J., Piel, M., Schmit, A.C., Apiou, F., Vonesch, J.L., Kock, M., Bornens, M., *et al.* (2003). PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J Cell Sci* 116, 1551-1562.

-B-

Bai, P., Houten, S.M., Huber, A., Schreiber, V., Watanabe, M., Kiss, B., de Murcia, G., Auwerx, J., and Menissier-de Murcia, J. (2007). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 [corrected] controls adipocyte differentiation and adipose tissue function through the regulation of the activity of the retinoid X receptor/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma [corrected] heterodimer. *J Biol Chem* 282, 37738-37746.

Baudat, F., Manova, K., Yuen, J.P., Jasin, M., and Keeney, S. (2000). Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell* 6, 989-998.

Bauersachs, S., Ulbrich, S.E., Gross, K., Schmidt, S.E., Meyer, H.H., Wenigerkind, H., Vermehren, M., Sinowatz, F., Blum, H., and Wolf, E. (2006). Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction* 132, 319-331.

Beisel, C., and Paro, R. (2011). Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nat Rev Genet* 12, 123-135.

Blick, T., Widodo, E., Hugo, H., Waltham, M., Lenburg, M.E., Neve, R.M., and Thompson, E.W. (2008). Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis* 25, 629-642.

Boehler, C., and Dantzer, F. (2011). PARP-3, a DNA-dependent PARP with emerging roles in double-strand break repair and mitotic progression. *Cell Cycle* 10, 1023-1024.

Boehler, C., Gauthier, L.R., Mortusewicz, O., Biard, D.S., Saliou, J.M., Bresson, A., Sanglier-Cianferani, S., Smith, S., Schreiber, V., Boussin, F., *et al.* (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2783-2788.

Bothmer, A., Robbiani, D.F., Feldhahn, N., Gazumyan, A., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2010). 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *J Exp Med* 207, 855-865.

Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J.M., Pieterse, M., Bartkova, J., van der Gulden, H., Hiddingh, S., Thanasoula, M., Kulkarni, A., Yang, Q., *et al.* (2010). 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat Struct Mol Biol* 17, 688-695.

Boye, E., Kohnlein, W., and Skarstad, K. (1984). Characterization of intracellular DNA strand breaks induced by neocarzinostatin in *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res* 12, 8281-8291.

- Brinkley, B.R. (2001). Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol* 11, 18-21.
- Bross, L., Fukita, Y., McBlane, F., Demolliere, C., Rajewsky, K., and Jacobs, H. (2000). DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity* 13, 589-597.
- Bryant, H.E., Petermann, E., Schultz, N., Jemth, A.S., Loseva, O., Issaeva, N., Johansson, F., Fernandez, S., McGlynn, P., and Helleday, T. (2009). PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *Embo J* 28, 2601-2615.
- Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., and Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434, 913-917.
- Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., *et al.* (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141, 243-254.
- Burger, R.M., Peisach, J., and Horwitz, S.B. (1981). Mechanism of bleomycin action: in vitro studies. *Life Sci* 28, 715-727.

-C-

- Caldecott, K.W. (2007). Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin. *DNA Repair (Amst)* 6, 443-453.
- Caldecott, K.W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* 9, 619-631.
- Caldecott, K.W., Aoufouchi, S., Johnson, P., and Shall, S. (1996). XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res* 24, 4387-4394.
- Casali, P., and Zan, H. (2004). Class switching and Myc translocation: how does DNA break? *Nat Immunol* 5, 1101-1103.
- Celli, G.B., and de Lange, T. (2005). DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat Cell Biol* 7, 712-718.
- Chang, P., Coughlin, M., and Mitchison, T.J. (2005a). Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function. *Nat Cell Biol* 7, 1133-1139.
- Chang, P., Coughlin, M., and Mitchison, T.J. (2009). Interaction between Poly(ADP-ribose) and NuMA contributes to mitotic spindle pole assembly. *Mol Biol Cell* 20, 4575-4585.
- Chang, W., Dynek, J.N., and Smith, S. (2005b). NuMA is a major acceptor of poly(ADP-ribosylation) by tankyrase 1 in mitosis. *Biochem J* 391, 177-184.
- Cheng, Q., Barboule, N., Frit, P., Gomez, D., Bombarde, O., Couderc, B., Ren, G.S., Salles, B., and Calsou, P. (2011). Ku counteracts mobilization of PARP1 and MRN in chromatin damaged with DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* 39, 9605-9619.
- Chi, N.W., and Lodish, H.F. (2000). Tankyrase is a golgi-associated mitogen-activated protein kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles. *J Biol Chem* 275, 38437-38444.
- Chiang, Y.J., Hsiao, S.J., Yver, D., Cushman, S.W., Tessarollo, L., Smith, S., and Hodes, R.J. (2008). Tankyrase 1 and tankyrase 2 are essential but redundant for mouse embryonic development. *PLoS One* 3, e2639.

- Chionh, F., Mitchell, G., Lindeman, G.J., Friedlander, M., and Scott, C.L. (2011). The role of poly adenosine diphosphate ribose polymerase inhibitors in breast and ovarian cancer: current status and future directions. *Asia Pac J Clin Oncol* 7, 197-211.
- Cho, S.H., Goenka, S., Henttinen, T., Gudapati, P., Reinikainen, A., Eischen, C.M., Lahesmaa, R., and Boothby, M. (2009). PARP-14, a member of the B aggressive lymphoma family, transduces survival signals in primary B cells. *Blood* 113, 2416-2425.
- Chou, D.M., Adamson, B., Dephoure, N.E., Tan, X., Nottke, A.C., Hurov, K.E., Gygi, S.P., Colaiacovo, M.P., and Elledge, S.J. (2010). A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18475-18480.
- Chou, H.Y., Chou, H.T., and Lee, S.C. (2006). CDK-dependent activation of poly(ADP-ribose) polymerase member 10 (PARP10). *J Biol Chem* 281, 15201-15207.
- Coleman, K.A., and Greenberg, R.A. (2011). The BRCA1-RAP80 complex regulates DNA repair mechanism utilization by restricting end resection. *J Biol Chem* 286, 13669-13680.
- Coll, J.M., Hickey, R.J., Cronkey, E.A., Jiang, H.Y., Schnaper, L., Lee, M.Y., Uitto, L., Syvaaja, J.E., and Malkas, L.H. (1997). Mapping specific protein-protein interactions within the core component of the breast cell DNA synthesome. *Oncol Res* 9, 629-639.
- Compton, D.A., Szilak, I., and Cleveland, D.W. (1992). Primary structure of NuMA, an intranuclear protein that defines a novel pathway for segregation of proteins at mitosis. *J Cell Biol* 116, 1395-1408.
- Cook, B.D., Dynek, J.N., Chang, W., Shostak, G., and Smith, S. (2002). Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol* 22, 332-342.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J* 17, 1195-1214.
- Couto, C.A., Wang, H.Y., Green, J.C., Kiely, R., Siddaway, R., Borer, C., Pears, C.J., and Lakin, N.D. (2011). PARP regulates nonhomologous end joining through retention of Ku at double-strand breaks. *J Cell Biol* 194, 367-375.
- Cruet-Hennequart, S., Coyne, S., Glynn, M.T., Oakley, G.G., and Carty, M.P. (2006). UV-induced RPA phosphorylation is increased in the absence of DNA polymerase eta and requires DNA-PK. *DNA Repair (Amst)* 5, 491-504.

-D-

- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G.G. (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342 (Pt 2), 249-268.
- Dantzer, F., de La Rubia, G., Menissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2000). Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* 39, 7559-7569.
- Dantzer, F., Giraud-Panis, M.J., Jaco, I., Ame, J.C., Schultz, I., Blasco, M., Koering, C.E., Gilson, E., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G., *et al.* (2004). Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Mol Cell Biol* 24, 1595-1607.
- Dantzer, F., Mark, M., Quenet, D., Scherthan, H., Huber, A., Liebe, B., Monaco, L., Chicheportiche, A., Sassone-Corsi, P., de Murcia, G., *et al.* (2006). Poly(ADP-ribose)

polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 14854-14859.

Dantzer, F., Noel, G., and Schreiber, V. (2011). [PARP inhibitors: significant progress in cancer therapy]. *Bull Cancer* *98*, 277-290.

David, K.K., Andrabi, S.A., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2009). Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci* *14*, 1116-1128.

Davidovic, L., Vodenicharov, M., Affar, E.B., and Poirier, G.G. (2001). Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res* *268*, 7-13.

Davis, M.E., Zuckerman, J.E., Choi, C.H., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C.A., Yen, Y., Heidel, J.D., and Ribas, A. (2010). Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* *464*, 1067-1070.

de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* *19*, 2100-2110.

de Murcia, G., Huletsky, A., Lamarre, D., Gaudreau, A., Pouyet, J., Daune, M., and Poirier, G.G. (1986). Modulation of chromatin superstructure induced by poly(ADP-ribose) synthesis and degradation. *J Biol Chem* *261*, 7011-7017.

De Vos, M., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2012). The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem Pharmacol* *84*, 137-146.

Dent, R., Hanna, W.M., Trudeau, M., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S.A. (2009). Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* *115*, 423-428.

Derycke, L.D., and Bracke, M.E. (2004). N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol* *48*, 463-476.

Desnoyers, S., Shah, G.M., Brochu, G., Hoflack, J.C., Verreault, A., and Poirier, G.G. (1995). Biochemical properties and function of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochimie* *77*, 433-438.

Dever, S.M., Golding, S.E., Rosenberg, E., Adams, B.R., Idowu, M.O., Quillin, J.M., Valerie, N., Xu, B., Povirk, L.F., and Valerie, K. (2011). Mutations in the BRCT binding site of BRCA1 result in hyper-recombination. *Aging (Albany NY)* *3*, 515-532.

Dever, S.M., White, E.R., Hartman, M.C., and Valerie, K. (2012). BRCA1-directed, enhanced and aberrant homologous recombination: mechanism and potential treatment strategies. *Cell Cycle* *11*, 687-694.

Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* *76*, 1-22.

Di Paola, S., Micaroni, M., Di Tullio, G., Buccione, R., and Di Girolamo, M. (2012). PARP16/ARTD15 Is a Novel Endoplasmic-Reticulum-Associated Mono-ADP-Ribosyltransferase That Interacts with, and Modifies Karyopherin-ss1. *PLoS One* *7*, e37352.

Dregalla, R.C., Zhou, J., Idate, R.R., Battaglia, C.L., Liber, H.L., and Bailey, S.M. (2010). Regulatory roles of tankyrase 1 at telomeres and in DNA repair: suppression of T-SCE and stabilization of DNA-PKcs. *Aging (Albany NY)* *2*, 691-708.

Durandy, A. (2003). Activation-induced cytidine deaminase: a dual role in class-switch recombination and somatic hypermutation. *Eur J Immunol* *33*, 2069-2073.

-E-

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365, 1687-1717.

Edwards, S.L., Brough, R., Lord, C.J., Natrajan, R., Vatcheva, R., Levine, D.A., Boyd, J., Reis-Filho, J.S., and Ashworth, A. (2008). Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature* 451, 1111-1115.

El-Khamisy, S.F., Masutani, M., Suzuki, H., and Caldecott, K.W. (2003). A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 31, 5526-5533.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.

Elstrodt, F., Hollestelle, A., Nagel, J.H., Gorin, M., Wasielewski, M., van den Ouweland, A., Merajver, S.D., Ethier, S.P., and Schutte, M. (2006). BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer Res* 66, 41-45.

-F-

Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., *et al.* (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917-921.

Fattah, F., Lee, E.H., Weisensel, N., Wang, Y., Lichter, N., and Hendrickson, E.A. (2010). Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells. *PLoS Genet* 6, e1000855.

Fong, P.C., Boss, D.S., Yap, T.A., Tutt, A., Wu, P., Mergui-Roelvink, M., Mortimer, P., Swaisland, H., Lau, A., O'Connor, M.J., *et al.* (2009). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 361, 123-134.

-G-

Gaglio, T., Saredi, A., and Compton, D.A. (1995). NuMA is required for the organization of microtubules into aster-like mitotic arrays. *J Cell Biol* 131, 693-708.

Gelmini, S., Poggesi, M., Distante, V., Bianchi, S., Simi, L., Luconi, M., Raggi, C.C., Cataliotti, L., Pazzagli, M., and Orlando, C. (2004). Tankyrase, a positive regulator of telomere elongation, is over expressed in human breast cancer. *Cancer Lett* 216, 81-87.

Gieni, R.S., Ismail, I.H., Campbell, S., and Hendzel, M.J. (2011). Polycomb group proteins in the DNA damage response: a link between radiation resistance and "stemness". *Cell Cycle* 10, 883-894.

Godinho, S.A., Kwon, M., and Pellman, D. (2009). Centrosomes and cancer: how cancer cells divide with too many centrosomes. *Cancer Metastasis Rev* 28, 85-98.

Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2007). Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20902-20907.

-H-

- Haber, J.E. (1999). DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* 24, 271-275.
- Hakme, A., Huber, A., Dolle, P., and Schreiber, V. (2008a). The macroPARP genes Parp-9 and Parp-14 are developmentally and differentially regulated in mouse tissues. *Dev Dyn* 237, 209-215.
- Hakme, A., Wong, H.K., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2008b). The expanding field of poly(ADP-ribosylation) reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO Rep* 9, 1094-1100.
- Harborth, J., Wang, J., Gueth-Hallonet, C., Weber, K., and Osborn, M. (1999). Self assembly of NuMA: multiarm oligomers as structural units of a nuclear lattice. *Embo J* 18, 1689-1700.
- Haren, L., Gnadt, N., Wright, M., and Merdes, A. (2009). NuMA is required for proper spindle assembly and chromosome alignment in prometaphase. *BMC Res Notes* 2, 64.
- Hassa, P.O., Buerki, C., Lombardi, C., Imhof, R., and Hottiger, M.O. (2003). Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *J Biol Chem* 278, 45145-45153.
- Hatakeyama, K., Nemoto, Y., Ueda, K., and Hayaishi, O. (1986). Purification and characterization of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Different modes of action on large and small poly(ADP-ribose). *J Biol Chem* 261, 14902-14911.
- Hayakawa, S., Shiratori, S., Yamato, H., Kameyama, T., Kitatsuji, C., Kashigi, F., Goto, S., Kameoka, S., Fujikura, D., Yamada, T., *et al.* (2011). ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses. *Nat Immunol* 12, 37-44.
- Heale, J.T., Ball, A.R., Jr., Schmiesing, J.A., Kim, J.S., Kong, X., Zhou, S., Hudson, D.F., Earnshaw, W.C., and Yokomori, K. (2006). Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex and functions in DNA single-strand break repair. *Mol Cell* 21, 837-848.
- Heeres, J.T., and Hergenrother, P.J. (2007). Poly(ADP-ribose) makes a date with death. *Curr Opin Chem Biol* 11, 644-653.
- Hochegger, H., Dejsuphong, D., Fukushima, T., Morrison, C., Sonoda, E., Schreiber, V., Zhao, G.Y., Saberi, A., Masutani, M., Adachi, N., *et al.* (2006). Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells. *Embo J* 25, 1305-1314.
- Hottiger, M.O., Hassa, P.O., Luscher, B., Schuler, H., and Koch-Nolte, F. (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci* 35, 208-219.
- Hsiao, S.J., and Smith, S. (2008). Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie* 90, 83-92.
- Hsiao, S.J., and Smith, S. (2009). Sister telomeres rendered dysfunctional by persistent cohesion are fused by NHEJ. *J Cell Biol* 184, 515-526.
- Hu, Y., Scully, R., Sobhian, B., Xie, A., Shestakova, E., and Livingston, D.M. (2011). RAP80-directed tuning of BRCA1 homologous recombination function at ionizing radiation-induced nuclear foci. *Genes Dev* 25, 685-700.
- Huang, S.M., Mishina, Y.M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G.A., Charlat, O., Wiелlette, E., Zhang, Y., Wiessner, S., *et al.* (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461, 614-620.

Hubert, L., Jr., Lin, Y., Dion, V., and Wilson, J.H. (2011). Topoisomerase 1 and single-strand break repair modulate transcription-induced CAG repeat contraction in human cells. *Mol Cell Biol* 31, 3105-3112.

Hudelist, G., Pacher-Zavisin, M., Singer, C.F., Holper, T., Kubista, E., Schreiber, M., Manavi, M., Bilban, M., and Czerwenka, K. (2004). Use of high-throughput protein array for profiling of differentially expressed proteins in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 86, 281-291.

Hudis, C.A., and Gianni, L. (2011). Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncologist* 16 Suppl 1, 1-11.

Huertas, P., and Jackson, S.P. (2009). Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J Biol Chem* 284, 9558-9565.

-I-

Iarmarcovai, G., Botta, A., and Orsiere, T. (2007). [Changes in chromosome number, genetic instability, and occupational exposures]. *Bull Cancer* 94, 381-388.

Iliakis, G., Rosidi, B., Wang, M., and Wang, H. (2006). Plasmid-based assays for DNA end-joining in vitro. *Methods Mol Biol* 314, 123-131.

Ismail, I.H., Andrin, C., McDonald, D., and Hendzel, M.J. (2010). BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair. *J Cell Biol* 191, 45-60.

-J-

Javle, M., and Curtin, N.J. (2011). The potential for poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in cancer therapy. *Ther Adv Med Oncol* 3, 257-267.

Johansson, M. (1999). A human poly(ADP-ribose) polymerase gene family (ADPRTL): cDNA cloning of two novel poly(ADP-ribose) polymerase homologues. *Genomics* 57, 442-445.

Juszczynski, P., Kutok, J.L., Li, C., Mitra, J., Aguiar, R.C., and Shipp, M.A. (2006). BAL1 and BBAP are regulated by a gamma interferon-responsive bidirectional promoter and are overexpressed in diffuse large B-cell lymphomas with a prominent inflammatory infiltrate. *Mol Cell Biol* 26, 5348-5359.

-K-

Kalisch, T., Ame, J.C., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2012). New readers and interpretations of poly(ADP-ribosylation). *Trends Biochem Sci*.

Kanai, M., Tong, W.M., Sugihara, E., Wang, Z.Q., Fukasawa, K., and Miwa, M. (2003). Involvement of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 and poly(ADP-Ribosylation) in regulation of centrosome function. *Mol Cell Biol* 23, 2451-2462.

Karras, G.I., Kustatscher, G., Buhecha, H.R., Allen, M.D., Pugieux, C., Sait, F., Bycroft, M., and Ladurner, A.G. (2005). The macro domain is an ADP-ribose binding module. *Embo J* 24, 1911-1920.

- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *Embo J* 9, 1603-1614.
- Keith, G., Desgres, J., and de Murcia, G. (1990). Use of two-dimensional thin-layer chromatography for the components study of poly(adenosine diphosphate ribose). *Anal Biochem* 191, 309-313.
- Kenny, P.A., Lee, G.Y., Myers, C.A., Neve, R.M., Semeiks, J.R., Spellman, P.T., Lorenz, K., Lee, E.H., Barcellos-Hoff, M.H., Petersen, O.W., *et al.* (2007). The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol* 1, 84-96.
- Kerns, J.A., Emerman, M., and Malik, H.S. (2008). Positive selection and increased antiviral activity associated with the PARP-containing isoform of human zinc-finger antiviral protein. *PLoS Genet* 4, e21.
- Khatau, S.B., Hale, C.M., Stewart-Hutchinson, P.J., Patel, M.S., Stewart, C.L., Searson, P.C., Hodzic, D., and Wirtz, D. (2009). A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19017-19022.
- Kickhoefer, V.A., Siva, A.C., Kedersha, N.L., Inman, E.M., Ruland, C., Streuli, M., and Rome, L.H. (1999). The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol* 146, 917-928.
- Kleer, C.G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S.A., Ghosh, D., Sewalt, R.G., Otte, A.P., Hayes, D.F., *et al.* (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11606-11611.
- Kleine, H., Poreba, E., Lesniewicz, K., Hassa, P.O., Hottiger, M.O., Litchfield, D.W., Shilton, B.H., and Luscher, B. (2008). Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation. *Mol Cell* 32, 57-69.
- Kondo, N., Takahashi, A., Ono, K., and Ohnishi, T. (2010). DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J Nucleic Acids* 2010, 543531.
- Kraus, W.L. (2008). Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr Opin Cell Biol* 20, 294-302.
- Krishnakumar, R., and Kraus, W.L. (2010). The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell* 39, 8-24.
- Kwon, M., Godinho, S.A., Chandhok, N.S., Ganem, N.J., Azioune, A., They, M., and Pellman, D. (2008). Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev* 22, 2189-2203.

-L-

- Lan, L., Nakajima, S., Oohata, Y., Takao, M., Okano, S., Masutani, M., Wilson, S.H., and Yasui, A. (2004). In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13738-13743.
- Langelier, M.F., Planck, J.L., Roy, S., and Pascal, J.M. (2012). Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1. *Science* 336, 728-732.
- Lara, P.C., Pruschy, M., Zimmermann, M., and Henriquez-Hernandez, L.A. (2011). MVP and vaults: a role in the radiation response. *Radiat Oncol* 6, 148.

- Laulier, C., Barascu, A., Guirouilh-Barbat, J., Pennarun, G., Le Chalony, C., Chevalier, F., Palierne, G., Bertrand, P., Verbavatz, J.M., and Lopez, B.S. (2011). Bcl-2 inhibits nuclear homologous recombination by localizing BRCA1 to the endomembranes. *Cancer Res* 71, 3590-3602.
- Le, X.F., Bedrosian, I., Mao, W., Murray, M., Lu, Z., Keyomarsi, K., Lee, M.H., Zhao, J., and Bast, R.C., Jr. (2006). Anti-HER2 antibody trastuzumab inhibits CDK2-mediated NPAT and histone H4 expression via the PI3K pathway. *Cell Cycle* 5, 1654-1661.
- Lehtio, L., Jemth, A.S., Collins, R., Loseva, O., Johansson, A., Markova, N., Hammarstrom, M., Flores, A., Holmberg-Schiavone, L., Weigelt, J., *et al.* (2009). Structural basis for inhibitor specificity in human poly(ADP-ribose) polymerase-3. *J Med Chem* 52, 3108-3111.
- Lemaitre, C., Fischer, B., Kalousi, A., Hoffbeck, A.S., Guirouilh-Barbat, J., Shahar, O.D., Genet, D., Goldberg, M., Bertrand, P., Lopez, B., *et al.* (2012). The nucleoporin 153, a novel factor in double-strand break repair and DNA damage response. *Oncogene*.
- Leppard, J.B., Dong, Z., Mackey, Z.B., and Tomkinson, A.E. (2003). Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* 23, 5919-5927.
- Levin, D.S., McKenna, A.E., Motycka, T.A., Matsumoto, Y., and Tomkinson, A.E. (2000). Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair. *Curr Biol* 10, 919-922.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810.
- Loseva, O., Jemth, A.S., Bryant, H.E., Schuler, H., Lehtio, L., Karlberg, T., and Helleday, T. (2010). PARP-3 is a mono-ADP-ribosylase that activates PARP-1 in the absence of DNA. *J Biol Chem* 285, 8054-8060.
- Luderus, M.E., den Blaauwen, J.L., de Smit, O.J., Compton, D.A., and van Driel, R. (1994). Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol* 14, 6297-6305.
- Lyons, R.J., Deane, R., Lynch, D.K., Ye, Z.S., Sanderson, G.M., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., and Daly, R.J. (2001). Identification of a novel human tankyrase through its interaction with the adaptor protein Grb14. *J Biol Chem* 276, 17172-17180.

-M-

- Ma, Q., Baldwin, K.T., Renzelli, A.J., McDaniel, A., and Dong, L. (2001). TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase: a novel response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 499-506.
- Macrae, C.J., McCulloch, R.D., Ylanko, J., Durocher, D., and Koch, C.A. (2008). APLF (C2orf13) facilitates nonhomologous end-joining and undergoes ATM-dependent hyperphosphorylation following ionizing radiation. *DNA Repair (Amst)* 7, 292-302.
- Malu, S., Malshetty, V., Francis, D., and Cortes, P. (2012). Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination. *Immunol Res*.
- Mansour, W.Y., Rhein, T., and Dahm-Daphi, J. (2010). The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res* 38, 6065-6077.
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1998). XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* 18, 3563-3571.

- Masutani, M., Nozaki, T., Nakamoto, K., Nakagama, H., Suzuki, H., Kusuoka, O., Tsutsumi, M., and Sugimura, T. (2000). The response of Parp knockout mice against DNA damaging agents. *Mutat Res* 462, 159-166.
- McCabe, N., Cerone, M.A., Ohishi, T., Seimiya, H., Lord, C.J., and Ashworth, A. (2009). Targeting Tankyrase 1 as a therapeutic strategy for BRCA-associated cancer. *Oncogene* 28, 1465-1470.
- McCabe, N., Turner, N.C., Lord, C.J., Kluzek, K., Bialkowska, A., Swift, S., Giavara, S., O'Connor, M.J., Tutt, A.N., Zdzienicka, M.Z., *et al.* (2006). Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res* 66, 8109-8115.
- Mehrotra, P., Riley, J.P., Patel, R., Li, F., Voss, L., and Goenka, S. (2011). PARP-14 functions as a transcriptional switch for Stat6-dependent gene activation. *J Biol Chem* 286, 1767-1776.
- Menissier de Murcia, J., Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Ame, J.C., Dierich, A., LeMeur, M., *et al.* (2003). Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *Embo J* 22, 2255-2263.
- Merdes, A., Ramyar, K., Vechio, J.D., and Cleveland, D.W. (1996). A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell* 87, 447-458.
- Mladenov, E., and Iliakis, G. (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res* 711, 61-72.
- Mortusewicz, O., Ame, J.C., Schreiber, V., and Leonhardt, H. (2007). Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucleic Acids Res* 35, 7665-7675.
- Mortusewicz, O., and Leonhardt, H. (2007). XRCC1 and PCNA are loading platforms with distinct kinetic properties and different capacities to respond to multiple DNA lesions. *BMC Mol Biol* 8, 81.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-563.

-N-

- Neale, M.J., Ramachandran, M., Trelles-Sticken, E., Scherthan, H., and Goldman, A.S. (2002). Wild-type levels of Spo11-induced DSBs are required for normal single-strand resection during meiosis. *Mol Cell* 9, 835-846.
- Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.P., Tong, F., *et al.* (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10, 515-527.
- Nick McElhinny, S.A., Havener, J.M., Garcia-Diaz, M., Juarez, R., Bebenek, K., Kee, B.L., Blanco, L., Kunkel, T.A., and Ramsden, D.A. (2005). A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol Cell* 19, 357-366.
- Nicolas, L., Martinez, C., Baro, C., Rodriguez, M., Baroja-Mazo, A., Sole, F., Flores, J.M., Ampurdanes, C., Dantzer, F., Martin-Caballero, J., *et al.* (2010). Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-2 leads to rapid development of spontaneous T-cell lymphomas in p53-deficient mice. *Oncogene* 29, 2877-2883.

Nigg, E.A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* 2, 815-825.

-O-

O'Shaughnessy, J., Osborne, C., Pippen, J.E., Yoffe, M., Patt, D., Rocha, C., Koo, I.C., Sherman, B.M., and Bradley, C. (2011). Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 364, 205-214.

Ogino, H., Nozaki, T., Gunji, A., Maeda, M., Suzuki, H., Ohta, T., Murakami, Y., Nakagama, H., Sugimura, T., and Masutani, M. (2007). Loss of Parp-1 affects gene expression profile in a genome-wide manner in ES cells and liver cells. *BMC Genomics* 8, 41.

Oka, S., Kato, J., and Moss, J. (2006). Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J Biol Chem* 281, 705-713.

Oliver, F.J., Menissier-de Murcia, J., Nacci, C., Decker, P., Andriantsitohaina, R., Muller, S., de la Rubia, G., Stoclet, J.C., and de Murcia, G. (1999). Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *Embo J* 18, 4446-4454.

Onitilo, A.A., Engel, J.M., Greenlee, R.T., and Mukesh, B.N. (2009). Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res* 7, 4-13.

-P-

Pederson, T. (2006). The centrosome: built on an mRNA? *Nat Cell Biol* 8, 652-654.

Pepper, D.A., and Brinkley, B.R. (1980). Tubulin nucleation and assembly in mitotic cells: evidence for nucleic acids in kinetochores and centrosomes. *Cell Motil* 1, 1-15.

Pfeiffer, P., Goedecke, W., and Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15, 289-302.

Phulwani, N.K., and Kielian, T. (2008). Poly (ADP-ribose) polymerases (PARPs) 1-3 regulate astrocyte activation. *J Neurochem* 106, 578-590.

Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M., and Althaus, F.R. (2000). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem* 275, 40974-40980.

-Q-

Quennet, V., Beucher, A., Barton, O., Takeda, S., and Lobrich, M. (2011). CtIP and MRN promote non-homologous end-joining of etoposide-induced DNA double-strand breaks in G1. *Nucleic Acids Res* 39, 2144-2152.

Quintyne, N.J., Reing, J.E., Hoffelder, D.R., Gollin, S.M., and Saunders, W.S. (2005). Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science* 307, 127-129.

-R-

- Radulescu, A.E., and Cleveland, D.W. (2010). NuMA after 30 years: the matrix revisited. *Trends Cell Biol* 20, 214-222.
- Rae, J.M., Creighton, C.J., Meck, J.M., Haddad, B.R., and Johnson, M.D. (2007). MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells--a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. *Breast Cancer Res Treat* 104, 13-19.
- Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2012). [Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer Radiother* 16, 1-10.
- Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2009). Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 16, 819-824.
- Richardson, C., Horikoshi, N., and Pandita, T.K. (2004). The role of the DNA double-strand break response network in meiosis. *DNA Repair (Amst)* 3, 1149-1164.
- Ring, D., Hubble, R., and Kirschner, M. (1982). Mitosis in a cell with multiple centrioles. *J Cell Biol* 94, 549-556.
- Rippmann, J.F., Damm, K., and Schnapp, A. (2002). Functional characterization of the poly(ADP-ribose) polymerase activity of tankyrase 1, a potential regulator of telomere length. *J Mol Biol* 323, 217-224.
- Robert, I., Dantzer, F., and Reina-San-Martin, B. (2009). Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 206, 1047-1056.
- Robertson, J.F., Willsher, P.C., Winterbottom, L., Blamey, R.W., and Thorpe, S. (1999). Onapristone, a progesterone receptor antagonist, as first-line therapy in primary breast cancer. *Eur J Cancer* 35, 214-218.
- Rojas, E., Mussali, P., Tovar, E., and Valverde, M. (2009). DNA-AP sites generation by etoposide in whole blood cells. *BMC Cancer* 9, 398.
- Romanienko, P.J., and Camerini-Otero, R.D. (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* 6, 975-987.
- Rosidi, B., Wang, M., Wu, W., Sharma, A., Wang, H., and Iliakis, G. (2008). Histone H1 functions as a stimulatory factor in backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res* 36, 1610-1623.
- Rottenberg, S., Jaspers, J.E., Kersbergen, A., van der Burg, E., Nygren, A.O., Zander, S.A., Derksen, P.W., de Bruin, M., Zevenhoven, J., Lau, A., *et al.* (2008). High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17079-17084.
- Rouleau, M., El-Alfy, M., Levesque, M.H., and Poirier, G.G. (2009). Assessment of PARP-3 distribution in tissues of cynomolgous monkeys. *J Histochem Cytochem* 57, 675-685.
- Rouleau, M., McDonald, D., Gagne, P., Ouellet, M.E., Droit, A., Hunter, J.M., Dutertre, S., Prigent, C., Hendzel, M.J., and Poirier, G.G. (2007). PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery. *J Cell Biochem* 100, 385-401.
- Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M.J., Kaufmann, S.H., and Poirier, G.G. (2010). PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer* 10, 293-301.

Rouleau, M., Saxena, V., Rodrigue, A., Paquet, E.R., Gagnon, A., Hendzel, M.J., Masson, J.Y., Ekker, M., and Poirier, G.G. (2011). A key role for poly(ADP-ribose) polymerase 3 in ectodermal specification and neural crest development. *PLoS One* 6, e15834.

Ruf, A., Mennissier de Murcia, J., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1996). Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7481-7485.

Ruf, A., Rolli, V., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1998). The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis. *J Mol Biol* 278, 57-65.

Rulten, S.L., Fisher, A.E., Robert, I., Zuma, M.C., Rouleau, M., Ju, L., Poirier, G., Reina-San-Martin, B., and Caldecott, K.W. (2011). PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. *Mol Cell* 41, 33-45.

-S-

Saxena, A., Saffery, R., Wong, L.H., Kalitsis, P., and Choo, K.H. (2002a). Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *J Biol Chem* 277, 26921-26926.

Saxena, A., Wong, L.H., Kalitsis, P., Earle, E., Shaffer, L.G., and Choo, K.H. (2002b). Poly(ADP-ribose) polymerase 2 localizes to mammalian active centromeres and interacts with PARP-1, Cenpa, Cenpb and Bub3, but not Cenpc. *Hum Mol Genet* 11, 2319-2329.

Schreiber, V., Ame, J.C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Mennissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* 277, 23028-23036.

Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C., and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 517-528.

Shao, R.G., Cao, C.X., Zhang, H., Kohn, K.W., Wold, M.S., and Pommier, Y. (1999). Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes. *Embo J* 18, 1397-1406.

Silk, A.D., Holland, A.J., and Cleveland, D.W. (2009). Requirements for NuMA in maintenance and establishment of mammalian spindle poles. *J Cell Biol* 184, 677-690.

Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal, D.S., Boulares, A.H., Hickey, R.J., Malkas, L.H., Coll, J.M., and Smulson, M.E. (1998). Regulation of the expression or recruitment of components of the DNA synthesome by poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemistry* 37, 9363-9370.

Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.

Smith, S. (2001). The world according to PARP. *Trends Biochem Sci* 26, 174-179.

Smith, S., and de Lange, T. (2000). Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* 10, 1299-1302.

Smith, S., Giriat, I., Schmitt, A., and de Lange, T. (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484-1487.

Smogorzewska, A., Karlseder, J., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., and de Lange, T. (2002). DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr Biol* 12, 1635-1644.

Sparmann, A., and van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 846-856.

Stavnezer, J., Guikema, J.E., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 26, 261-292.

Sukhanova, M., Khodyreva, S., and Lavrik, O. (2010). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase beta in long patch base excision repair. *Mutat Res* 685, 80-89.

Szanto, M., Brunyanszki, A., Kiss, B., Nagy, L., Gergely, P., Virag, L., and Bai, P. (2012). Poly(ADP-ribose) polymerase-2: emerging transcriptional roles of a DNA-repair protein. *Cell Mol Life Sci*.

-T-

Takei, D., Ishihara, H., Yamaguchi, S., Yamada, T., Tamura, A., Katagiri, H., Maruyama, Y., and Oka, Y. (2006). WFS1 protein modulates the free Ca(2+) concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 580, 5635-5640.

Teng, G., and Papavasiliou, F.N. (2007). Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu Rev Genet* 41, 107-120.

Thomas, C.H., Collier, J.H., Sfeir, C.S., and Healy, K.E. (2002). Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1972-1977.

-U-

Ueda, K., Oka, J., Naruniya, S., Miyakawa, N., and Hayaishi, O. (1972). Poly ADP-ribose glycohydrolase from rat liver nuclei, a novel enzyme degrading the polymer. *Biochem Biophys Res Commun* 46, 516-523.

-V-

van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H., and Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2, 196-206.

Vilenchik, M.M., and Knudson, A.G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12871-12876.

Virag, L., and Szabo, C. (2002). The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54, 375-429.

von Kobbe, C., Harrigan, J.A., Schreiber, V., Stiegler, P., Piotrowski, J., Dawut, L., and Bohr, V.A. (2004). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates both the exonuclease and helicase activities of the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res* 32, 4003-4014.

-W-

- Wacker, D.A., Ruhl, D.D., Balagamwala, E.H., Hope, K.M., Zhang, T., and Kraus, W.L. (2007). The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription. *Mol Cell Biol* 27, 7475-7485.
- Wahlberg, E., Karlberg, T., Kouznetsova, E., Markova, N., Macchiarulo, A., Thorsell, A.G., Pol, E., Frostell, A., Ekblad, T., Oncu, D., *et al.* (2012). Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors. *Nat Biotechnol* 30, 283-288.
- Wang, H., Guan, J., Perrault, A.R., Wang, Y., and Iliakis, G. (2001). Replication protein A2 phosphorylation after DNA damage by the coordinated action of ataxia telangiectasia-mutated and DNA-dependent protein kinase. *Cancer Res* 61, 8554-8563.
- Wang, H., Perrault, A.R., Takeda, Y., Qin, W., and Iliakis, G. (2003). Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res* 31, 5377-5388.
- Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., and Iliakis, G. (2005). DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res* 65, 4020-4030.
- Wang, M., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., and Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res* 34, 6170-6182.
- Wang, Z., Michaud, G.A., Cheng, Z., Zhang, Y., Hinds, T.R., Fan, E., Cong, F., and Xu, W. (2012). Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly(ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly(ADP-ribosyl)ation-dependent ubiquitination. *Genes Dev* 26, 235-240.
- Wu, X., Feng, J., Komori, A., Kim, E.C., Zan, H., and Casali, P. (2003). Immunoglobulin somatic hypermutation: double-strand DNA breaks, AID and error-prone DNA repair. *J Clin Immunol* 23, 235-246.

-X-

- Xu, X., Weaver, Z., Linke, S.P., Li, C., Gotay, J., Wang, X.W., Harris, C.C., Ried, T., and Deng, C.X. (1999). Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell* 3, 389-395.

-Y-

- Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., *et al.* (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 449, 478-482.
- Yelamos, J., Monreal, Y., Saenz, L., Aguado, E., Schreiber, V., Mota, R., Fuente, T., Minguela, A., Parrilla, P., de Murcia, G., *et al.* (2006). PARP-2 deficiency affects the survival of CD4+CD8+ double-positive thymocytes. *Embo J* 25, 4350-4360.
- Yelamos, J., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2008). Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Trends Mol Med* 14, 169-178.

Yu, M., Zhang, C., Yang, Y., Yang, Z., Zhao, L., Xu, L., Wang, R., Zhou, X., and Huang, P. (2011). The interaction between the PARP10 protein and the NS1 protein of H5N1 AIV and its effect on virus replication. *Virology* 8, 546.

Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259-263.

Yu, X., Fu, S., Lai, M., Baer, R., and Chen, J. (2006). BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes Dev* 20, 1721-1726.

Yun, M.H., and Hiom, K. (2009). CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* 459, 460-463.

-Z-

Zeidler, M., Varambally, S., Cao, Q., Chinnaiyan, A.M., Ferguson, D.O., Merajver, S.D., and Kleer, C.G. (2005). The Polycomb group protein EZH2 impairs DNA repair in breast epithelial cells. *Neoplasia* 7, 1011-1019.

Zernik-Kobak, M., Vasunia, K., Connelly, M., Anderson, C.W., and Dixon, K. (1997). Sites of UV-induced phosphorylation of the p34 subunit of replication protein A from HeLa cells. *J Biol Chem* 272, 23896-23904.

Zhu, Y., and Gao, G. (2008). ZAP-mediated mRNA degradation. *RNA Biol* 5, 65-67.

Zink, D., Fischer, A.H., and Nickerson, J.A. (2004). Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 4, 677-687.

Christian BOEHLER



Rôles de la poly(ADP-ribose) polymérase-3 (PARP-3) dans la réponse cellulaire aux dommages dans l'ADN et la progression mitotique



Résumé

La Poly(ADP-ribosyl)ation est une modification post-traductionnelle des protéines catalysée par les Poly(ADP-Ribose) Polymérases. Nous avons débuté la caractérisation fonctionnelle d'un nouveau membre de cette famille : la Poly(ADP-Ribose) Polymérase-3 (PARP-3).

Nos travaux ont permis d'identifier cette protéine comme un nouvel acteur spécifique de la réponse cellulaire aux cassures double-brin de l'ADN (DSB).

Nous avons également identifié une interaction de PARP-3 avec la protéine NuMA, un régulateur essentiel de la division mitotique. Nos travaux ont mis en évidence l'existence d'un complexe protéique composé de PARP-3, NuMA et Tankyrase 1. PARP-3 a un rôle charnière dans la régulation de ce complexe. Ce dernier joue un rôle fondamental dans la progression mitotique.

Les rôles de PARP-3 dans les mécanismes de réparation des DSB ainsi que dans la progression mitotique en font une cible prometteuse en thérapie du cancer.

Mots-clés : PARP, ADN, réparation, mitose, NuMA

Résumé en anglais

Poly(ADP-ribosyl)ation is a post-translational modification of proteins mediated by poly(ADP-ribose) polymerases.

We started the functional characterization of a new member of this family : the Poly(ADP-Ribose) Polymerase-3 (PARP-3).

We generated PARP-3 depletion in human cell line using RNA interference to analyse consequences of PARP-3 absence. We identified PARP-3 as a new specific actor of Double-Strand Breaks (DSB) repair mechanism.

We also identified a new protein partner of PARP-3, NuMA, which is an essential regulator of mitotic division. Using biochemical approaches, we highlighted a protein complex composed of PARP-3, NuMA and Tankyrase-1. PARP-3 has a key role in the regulation of this complex. It plays essential role in mitotic progression.

The roles of PARP-3 in both DSB repair mechanisms and in mitotic progression indicate PARP-3 as a possible promising therapeutic target in cancer therapy.

Keywords : PARP, DNA, repair, mitosis, NuMA