

Table des matières

Liste des abréviations	1
Table des illustrations.....	6
INTRODUCTION.....	8
I. La GTPase Rho RND1	9
I.1. Les GTPases Rho.....	9
I.1.1. Organisation phylogénétique.....	9
I.1.2. Structure des GTPases Rho	10
I.1.3. Régulation des GTPases Rho « classiques ».....	11
I.1.4. Fonctions biologiques des GTPases Rho	12
I.1.4.1 Fonctions classiques.....	12
I.1.4.2 Rôle dans la réponse aux génotoxiques et à l'hypoxie	16
I.2. La GTPase RND1	22
I.2.1. La famille des RND.....	22
I.2.1.1 Identification de la famille RND.....	22
I.2.1.2 Structure des protéines RND	22
I.2.2. Expression et localisation de RND1.....	24
I.2.2.1 Expression tissulaire et cellulaire de RND1	24
I.2.2.2 Localisation cellulaire de RND1	24
I.2.3. Régulation de l'expression de RND1	26
I.2.3.1 Régulation transcriptionnelle et post transcriptionnelle	26
I.2.3.2 Régulation post-traductionnelle	29
I.2.4. Fonctions biologiques de RND1	29
I.2.4.1 Régulation de la morphologie cellulaire et du cytosquelette d'actine	29
I.2.4.2 Formation des connexions nerveuses.....	32
I.2.4.3 Rôle dans le développement embryonnaire.	38
I.2.4.4 Rôle dans l'angiogenèse	39
I.2.4.5 RND1 et cancer	40
II. Les inhibiteurs de la topoisomérase I.....	46
II.1. Les ADN topoisomérases	46
II.2. La topoisomérase I nucléaire (Top1).....	48
II.2.1. Organisation structurale de Top1	48
II.2.2. Cycle catalytique	50
II.2.3. Fonctions biologiques de la Top1	51
II.2.3.1 Relaxation des surenroulements de l'ADN au cours de la réplication et de la transcription.....	51
II.2.3.2 Rôles de la Top1 dans la signalisation et réparation des dommages à l'ADN	55
II.3. Les inhibiteurs de la topoisomérase I	57
II.3.1. Les inhibiteurs camptothécines	58
II.3.2. Inhibiteurs non CPT	62
II.4. Conséquences cellulaires de la CPT	64
II.4.1. Effets sur la réplication	64
II.4.2. Effets sur la transcription	64
II.4.3. Réparation des Top1cc irréversibles induits par la CPT	67
II.4.4. Production de DSB réplicationnelles et transcriptionnelles	69
II.4.4.1 DSB réplicationnelles	70
II.4.4.2 DSB transcriptionnelles	71

II.4.5.	Conséquences cellulaire des DSB induites par la CPT	72
II.4.5.1	Activation de la DDR en réponse aux DSB induites par la CPT	72
II.4.5.2	Réparation des DSB induites par la CPT	73
II.4.5.3	Apoptose induite par la CPT	73
III.	La protéine PARP1	76
III.1.	Famille PARP et PARylation	76
III.1.1.	PARylation	76
III.1.2.	Mécanismes de la liaison du PAR sur les protéines	77
III.1.2.1	Le motif PBM	78
III.1.2.2	Le domaine macro	78
III.1.2.3	Le domaine PBZ	79
III.1.2.4	Le domaine WWE	79
III.1.3.	Catabolisme de PAR	80
III.1.4.	Classifications des PARP	81
III.1.4.1	Les PARP ADN-dépendantes	83
III.1.4.2	Les tankyrases	86
III.1.4.3	Les PARP à doigt de zinc de type CCCH	87
III.1.4.4	Les macro-PARP	88
III.1.4.5	Les autres PARP	88
III.2.	Les fonctions biologiques de PARP1	89
III.2.1.	Rôles de PARP1 dans la réparation des dommages à l'ADN	89
III.2.1.1	Rôles de PARP1 dans la réparation des lésions simple-brin de l'ADN	89
III.2.1.2	Rôles de PARP1 dans la réparation des DSB	94
III.2.2.	Rôles de PARP1 dans le remodelage de la chromatine	98
III.2.2.1	Action directe de PARP1 sur la chromatine	98
III.2.2.2	Action indirecte de PARP1 sur la chromatine	98
III.2.3.	Rôles de PARP1 dans la transcription	99
III.2.3.1	En l'absence de dommages de l'ADN	99
III.2.3.2	Au niveau du dommage de l'ADN	103
III.2.4.	Rôles de PARP1 dans la stabilisation de l'ARNm	103
III.2.5.	Rôles de PARP1 dans la réplication	104
III.3.	Inhibiteurs de PARP	105
III.4.	Utilisation thérapeutique des inhibiteurs de PARP dans les cancers	107
III.4.1.	Association à la chimiothérapie et à la radiothérapie	108
III.4.2.	Létalité synthétique	108
III.4.3.	La résistance aux inhibiteurs de PARP	110
III.5.	Liens entre PARP1 et Top1	110
OBJECTIFS		112
RESULTATS		114
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		169
BIBLIOGRAPHIE		181
ANNEXES		211

Liste des abréviations

3-AB: 3-aminobenzamide	ARNr: acide ribonucléique ribosomique
4 OH-TAM: 4-hydroxytamoxifène	ART: ADP-ribosyl transférase
53BP1: p53-binding protein 1	ARTD: diphtheria-toxin-like ADP-ribosyltransferase
5-FU: 5-fluorouracile	ASF/SF2: alternative splicing factor /pre-mRNA-splicing factor
7-AAD: 7-aminoactinomycine d	ATM: ataxia telangiectasia mutated
8-oxoG: 7,8-dihydro-8-oxoguanine	ATR: ataxia telangiectasia and rad3-related protein
ABC: ATP-binding cassette transporter	AU: adenylate-uridylate
AD: automodification domain	Bak: Bcl-2 antagonist/killer
ADN : acide désoxyribonucléique	BAL: B-cell aggressive lymphoma
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire	BARD1: BRCA1 associated ring domain 1
AEM : agence européenne du médicament	Bax: Bcl-2 Associated X
AHR : aryl hydrocarbon receptor	BAZ1B: bromodomain adjacent to zinc finger domain 1B
AIF: apoptosis inducing factor	BBAP: B-lymphoma and BAL-associated protein
ALC1: amplified in liver cancer protein 1	BER: réparation par excision de base
AMM : autorisation de mise sur le marché	Bid: BH3 Interacting Domain Death Agonist
a-NHEJ: alternative non-homologous end-joining	BLM: bloom syndrome RecQ like helicase
ANK: ankyrine	BRCA1: breast cancer type 1 susceptibility protein
ANSM : agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé	BRCA2: breast cancer type 2 susceptibility protein
Apaf-1: apoptotic peptidase activating factor 1	BRCT: BRCA1 C-terminus
APH: aphidicoline	BRCT: breast cancer susceptibility protein-1 C terminus
APLF: aprataxin and pnpk like factor	BRD4: bromodomain-containing protein 4
ARE-BP: ARE binding proteins	Bru: bromouridine
AREs: AU rich elements	CA: constitutivement actif
Arf: ADP-ribosylation factor	CCLE: cancer cell line encyclopedia
ARH: ADP-ribosyl-acceptor hydrolase	Cdc42: cell division control protein 42 homolog
ARN: acide ribonucléique	
ARN pol II: ARN polymérase II	
ARNm: acide ribonucléique messenger	

CDK9: cyclin-dependent kinase 9	ERCC1 : excision repair cross-complementation group 1
CEO: carcinome épidermoïde de l'œsophage	ERK : extracellular signal-regulated kinase
CHC: carcinome hépato-cellulaire	eRNA : enhancer RNA
CHD2: chromodomain helicase DNA-binding protein 2	ETP : étoposide
CHFR: checkpoint with fork-head associated and ring finger domains	EU : 5-éthynyl uridine
Chk : checkpoint kinase	FACT: facilitates chromatin transcription
c-NHEJ : classical non-homologous end-joining	FADD : fas-associated protein with death domain
CPPC : cancer du poumon à petites cellules	FasL : fas-ligand
CPT : camptothécine	FDA : food drug administration
CSB : cockayne syndrome group B	FEN1 : flap endonuclease 1
CSG : cellule souches tumorale de glioblastome	FGF : facteur de croissance des fibroblastes
CTD : carboxyl-terminal domain	FGFR1 : récepteur aux facteurs de croissance des fibroblastes 1
C-ter : C-terminal	FLRT3 : fibronectin leucine rich transmembrane protein 3
DBD : DNA binding domain	FLV : flavopiridol
DDB : DNA damage binding protein	FOLFIRI : folinic acid fluorouracil irinotecan
DDR : DNA Damage Response	FRS2 β : FGFR substrate 2 β
DISC : death-inducing signaling complex	FTase : farnésyl transférase
DMSO : diméthylsulfoxyde	FTI : inhibiteur de FTase
DN : dominant négatif	GADD34 : growth arrest and dna-damage-inducible protein 34
DNA-PK : DNA-dependent protein kinase	GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
DNMT1 : DNA methyltransferase 1	GAPs : gtpases activating proteins
DRB : 5,6-dichloro-1-beta-d-ribofuranosyl benzimidazole	GDI : GDP dissociation inhibitor
DSB: double strand break	GDP : guanosine diphosphate
DSE : double strand end	GEF : guanine exchange factor
DSIF : DRB sensitivity-inducing factor	GFP : green fluorescent protein
E-cad : E-cadhérine	GG-NER : global genome NER
EMSY : BRCA2-interacting transcriptional repressor	GPI : glycosylphosphatidylinositol
EMT : transition épithélio-mésenchymateuse	Grb7 : growth factor receptor-bound protein 7

GTP : guanosine triphosphate	LPA : acide lysophosphatidique
H3K4me3 : histone 3 lysine 4 triméthylée	LPS : lipopolysaccharide
HAS : haute autorité de santé	MAR : mono-ADP-ribose
HD : helical subdomain	Mbp1p : mluI-box binding protein
HDAC : inhibiteur des histone-désacétylases	MDR : multidrug resistance
HIF-1 α : hypoxia-inducible factor-1 α	MEC : matrice extracellulaire
hnRNPA1 : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a1	MEF : mouse embryonic fibroblast
HPS : Résidus His-Pro-Ser	Mg ²⁺ : magnésium
HR : homologous recombination	miR : microRNA
HRR : homologous recombination repair	MLS : mitochondrial localization signal
HSF1 : heat shock transcription factor 1	MMC : mitomycine c
HSP : heat shock protein	MMR : mismatch repair
hTERT : human telomerase reverse transcriptase	MMS : méthanesulfonate de méthyle
HuR : human antigen R	MNNG : N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine
HUVEC : human umbilical vein endothelial cells	MNU : N-méthyl-N-nitrosourée
HUWE1 : HECT, UBA and WWE domain-containing protein 1	MP : membrane plasmique
IAPs : inhibitors of apoptosis proteins	MRE11 : meiotic recombination 11
IL-6 : interleukine-6	MRN : MRE11-RAD50-NBS1
IR : ionizing radiation	Mus81-Eme1 : essential meiotic structure-specific endonuclease 1
IUCT : institut universitaire du cancer de Toulouse	MVP-BD : major vault protein binding domain
Kap β 1 : karyopherin subunit beta 1	NAD ⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide
Kb : kilobase	Nbs1 : nijmegen breakage syndrome 1
KDM4D : lysine K-specific demethylase 4D	N-Cad : N-cadhérine
KDM5B : lysine K-specific demethylase 5B	NCBI : national center for biotechnology information
KO : knock-out	NELF : negative elongation factor
LC-MS/MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem	NER : réparation par excision de nucléotides
LIG : ligase	NES : nuclear export signal
lncRNA : long non-coding RNA	NFAT : nuclear factor of activated T cells
	NF- κ B : nuclear factor-kappa b
	NLS : nuclear localization signal

NoLS : nucleolar localization signal	ROS : reactive oxygen species
NR4A : nuclear receptor subfamily 4 group a	RPA : replication protein A
NRP : neuropiline	SAM : sterile alpha motif
N-ter : N-terminal	Sar : secretion-associated and Ras-related
NuRD : nucleosome remodeling and deacetylase	Sc- : surenroulements négatifs
Oct4 : octamer-binding transcription factor 4	Sc+ : surenroulements positifs
OPG : ostéoprotégérine	SCG10 : superior cervical ganglion 10
PAR : poly(ADP-ribose)	SH2 : Src homology 2
PARG : poly(ADP-ribose) glycohydrolase	shRNA : short hairpin RNA
PARP: poly(ADP-ribose) polymérase	siRNA : small interfering RNA
PBM : PAR-binding linear motif	SMARCA: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily A
PBZ : PAR-binding zinc-finger	snRNP : small nuclear ribonucleoprotein complex
PcG : polycomb group	SSB: single strand break
PCNA : proliferating cell nuclear antigen	STAT3 : signal transducer and activator of transcription 3
PgP : permeability-glycoprotein	STI1 : stress-inducible protein 1
PKC : protein kinase c	SUMO1 : small ubiquitin-related modifier-1
P-loop : phosphate-binding loop	SWI/SNF : switching defective/ sucrose non fermentor
PNKP : polynucleotide kinase phosphatase	Tankyrase : TRF1-interacting ankyrin-related adp-ribose polymerase
PP2A : protein phosphatase 2	TARG1 : terminal adp-ribose protein glycohydrolase 1
PRC2 : polycomb repressive complex 2	TBP : TATA-binding protein
P-TEFb : positive transcriptional elongation factor b	TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
Rab : ras-like proteins in brain	TC-DSB : cassure double-brin transcriptionnelle
Rac : ras-related C3 botulinum toxin substrate	TCGA : the cancer genome atlas
Ran: ras-like nuclear	TC-NER : transcription coupled NER
RAP80 : receptor-associated protein 80	TC-SSB : cassure simple-brin transcriptionnelle
RBP : RNA binding proteins	TDP1 : tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1
Rep-DSB : cassure double-brin répliationnelle	TF : facteur de transcription
Rho : Ras-homologous	
RNA-seq : RNA sequencing	
RNF : ring finger protein	
ROCK : Rho-associated protein kinase	

TGF- β : transforming growth factor beta
 THBS : thrombospondin-like
 tiPARP : TCDD inducible PARP
 TMZ : temozolomide
 TNF : tumor necrosis factor
 TNKS : tankyrase
 Top : topoisomérase
 Top1 : topoisomérase 1 nucléaire
 TOP1 : gène topoisomérase 1
 Top1cc : complexe de clivage Top1-ADN
 Top1mt : topoisomérase 1 mitochondriale
 Topors : topoisomerase I-binding RS protein
 TSA : trichostatine A
 TSS : site d'initiation de la transcription
 Ube3a : ubiquitin protein ligase E3A
 UGT1A1 : UDP glucuronosyltransférase-1 polypeptide A1
 UIM : ubiquitin-interacting motif
 UNC5B : unc-5 netrin receptor B

UTR : untranslated region
 UV : ultraviolet
 VEGF : vascular endothelial growth factor
 VIT : vault inter- α -trypsin
 vPARP : vault parp
 vWA : facteur de von willebrand de type A
 WGR : résidus Tyr-Gly-Arg
 WRN : werner syndrome RecQ Like Helicase
 WWE : triptophane(W) – triptophane (W) – acide glutamique (E)
 XPA/B/C/D/F/G : xeroderma pigmentosum group-
 A/B/C/D/F/G : complementing protein
 XPF-ERCC1 : Excision repair cross-complementation group 1
 XRCC : X-ray repair cross complementing
 ZC : zone corticale
 ZC3HAV1 : zinc finger cch-type antiviral 1
 ZnF : zinc finger
 ZPV : zone périventriculaire du cerveau

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique de la famille des GTPases Rho.....	10
Figure 2 : Alignement des séquences primaires des protéines Rac1, Cdc42 et RhoA.....	11
Figure 3 : Cycle d'activation/inactivation des GTPases Rho « classiques ».....	12
Figure 4 : Effets de RhoA, Rac1 et Cdc42 dans l'organisation du cytosquelette d'actine.....	13
Figure 5 : Alignement de séquences primaires de la famille RND comparées à RhoA, Rac1 et Cdc42.....	23
Figure 6 : L'extension de RND1 en N-terminal est importante pour sa localisation membranaire.....	25
Figure 7 : L'association de RND1 à la membrane plasmique est inhibée par l'ajout de FTL.....	26
Figure 8 : Effet de la surexpression de RND1 sur la formation des fibres de stress d'actine.....	30
Figure 9 : Schéma récapitulatif des effets de la liaison de RND1 à ses différents effecteurs sur la formation des fibres de stress d'actine.....	31
Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation du cytosquelette d'actine dans la polarité neuronale.....	33
Figure 11 : Structure générale des sémarophines, des plexines et des neuropilines.....	34
Figure 12 : Schéma récapitulatif des effets de RND1 sur la formation des connexions nerveuses dépendant de la plexine A1.....	35
Figure 13 : Schéma récapitulatif des effets de RND1 sur la formation des connexions nerveuses dépendant des plexines B1, B2 et B3.....	36
Figure 14 : Schéma récapitulatif des effets de RND1 sur la formation des connexions nerveuses indépendant des plexines.....	37
Figure 15 : Effets de RND1 sur le développement embryonnaire du xénope.....	38
Figure 16 : Schéma récapitulatif des effets de RND1 sur l'angiogenèse dans un mécanisme dépendant de la voie VEGFR/Calcineurine/NFATc1.....	39
Figure 17 : Schéma récapitulatif de l'effet de RND1 sur l'inhibition de l'EMT par inactivation de Ras.....	42
Figure 18 : Effets de RND1 l'inhibition de la tumorigenèse mammaire et la formation de métastases.....	43
Figure 19 : Schéma des différents mécanismes catalytiques des topoisomérases.....	48
Figure 20 : Schéma des domaines et structure 3D de la Top1 nucléaire humaine.....	49
Figure 21 : Cycle catalytique de la Top1.....	51
Figure 22 : Rôles de la Top1 dans la réplication.....	52
Figure 23 : Rôles de la Top1 dans la transcription.....	53
Figure 24 : Stabilisation de Top1cc par la CPT.....	59
Figure 25 : Structure des inhibiteurs de la Top1 camptothécines.....	61
Figure 26 : Structure des dérivés de la CPT modifiés au niveau du cycle E.....	62
Figure 27 : Structure des inhibiteurs non-CPT.....	63
Figure 28 : Représentation schématique des trois voies impliquées dans la réparation des Top1cc induits par la CPT.....	69
Figure 29 : Mécanisme de production des cassures double-brin réplicationnelles (Rep-DSB) par Top1cc.....	70
Figure 30 : Représentation schématique de la production des cassures double-brin transcriptionnelles (TC-DSB) par Top1cc.....	72
Figure 31 : Schéma des voies apoptotiques activées par la CPT.....	75

Figure 32 : Synthèse du Poly(ADP-ribose) (PAR).....	77
Figure 33 : Sites de reconnaissance de la structure du PAR par les domaines de liaison au PAR...	79
Figure 34 : Catabolisme de PAR.....	81
Figure 35 : Structures des domaines des membres de la famille PARP et de PARG.....	84
Figure 36 : Structure des domaines de PARP1 humaine et leurs fonctions associées.....	85
Figure 37 : Les sources de dommages à l'ADN et leurs voies de réparation associées.....	90
Figure 38 : Modèle de l'activation de PARP1 en réponse aux SSB.....	91
Figure 39 : Rôles de PARP1 dans la réparation des lésions simple-brin de l'ADN.....	93
Figure 40 : Modèle de l'activation de PARP1 en réponse aux DSB.....	95
Figure 41 : Rôles de PARP1 dans la réparation des DSB.....	97
Figure 42 : Rôles de PARP1 dans la régulation de la chromatine et l'augmentation de l'initiation de la transcription.....	101
Figure 43 : Rôle de PARP1 dans la régulation de l'élongation de la transcription de gènes.....	102
Figure 44 : Structure de l'inhibiteur de première génération de PARP, le 3-aminobenzamide (3-AB).....	105
Figure 45 : Structure des inhibiteurs de deuxième génération de PARP, les analogues des quinazolines.....	106
Figure 46 : Structure des inhibiteurs de troisième génération de PARP, les analogues du benzimidazoles.....	107
Figure 47 : Modèle proposé du rôle de RND1 dans la réponse cellulaire à la CPT.....	161

Tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des effecteurs majeurs, fonctions cellulaires, implications dans les cancers, localisations et modifications lipidiques des GTPases Rho.....	14
Tableau 2 : Mécanismes et effets biologiques médiés par les GTPases Rho suite à un dommage (stress génotoxiques et hypoxie).....	19
Tableau 3 : Principaux effecteurs interagissant avec RND1 et leurs fonctions.....	40
Tableau 4 : Classification des topoisomérases humaines.....	46
Tableau 5 : Lésions endogènes et exogènes de l'ADN induisant la formation de Top1cc.....	56
Tableau 6 : Résumé de l'activité catalytique des PARP.....	82

INTRODUCTION

I. La GTPase Rho RND1

I.1. Les GTPases Rho

I.1.1. Organisation phylogénétique

Les protéines Rho sont des protéines G monomériques, de faible masse moléculaire (20 à 30 kDa) appartenant à la superfamille Ras. Tous les membres de la superfamille Ras possèdent un domaine G permettant la fixation du GTP (Guanosine triphosphate) ou du GDP (Guanosine diphosphate). Les petites GTPases peuvent initier ou arrêter la transduction de signaux sous le contrôle de différents stimuli, pour réguler de nombreuses fonctions cellulaires. Sur la base de leur structure et/ou de leur fonction, les petites GTPases, constituées de plus de 150 membres, sont divisées en 5 sous familles (Wennerberg et al., 2005) :

- Ras : Régulation de l'expression génique, de la prolifération, de la différenciation, de la morphologie cellulaire et de l'apoptose.
- Rab (Ras-like proteins in brain) : Régulation du trafic vésiculaire intracellulaire.
- Arf/Sar (ADP-ribosylation factor/Secretion-associated and Ras-related) : Régulation du trafic vésiculaire intracellulaire, en particulier au niveau de l'appareil de Golgi.
- Ran (Ras-like nuclear) : Régulation du transport nucléocytoplasmique et organisation des microtubules lors de la mitose.
- Rho (Ras homologous) : Organisation du cytosquelette d'actine, progression du cycle cellulaire et migration cellulaire.

Chez les mammifères, la famille des Rho comprend 20 membres, répartis en 8 sous-familles en fonction de leur homologie de séquence : RND, RhoA, Rac, Cdc42, RhoU/V, RhoD/F, RhoH et RhoBTB (Boureux et al., 2007) (Figure 1). Au niveau de leur structure, les GTPases Rho partagent environ 30% d'identité avec les GTPases Ras et 40 à 95% d'identité entre elles (Wennerberg and Der, 2004). Les membres de la sous-famille RhoA, Rac, Cdc42 et RhoD/F fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires cyclant entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP, sous le contrôle de protéines régulatrices. Elles sont définies par le terme GTPases dites « classiques », en opposition aux GTPases « atypiques », regroupant les protéines de la sous-famille RND, RhoU/V, RhoH et RhoBTB qui lient de façon prédominante le GTP. Par rapport aux « GTPases classiques », ces protéines sont essentiellement régulées par des mécanismes de modification de l'expression génique, de

stabilisation protéique, de séquestration cytosolique, de régulation épigénétique ou encore de phosphorylation. (Aspenstrom et al., 2007; Chardin, 2006; Heasman and Ridley, 2008).

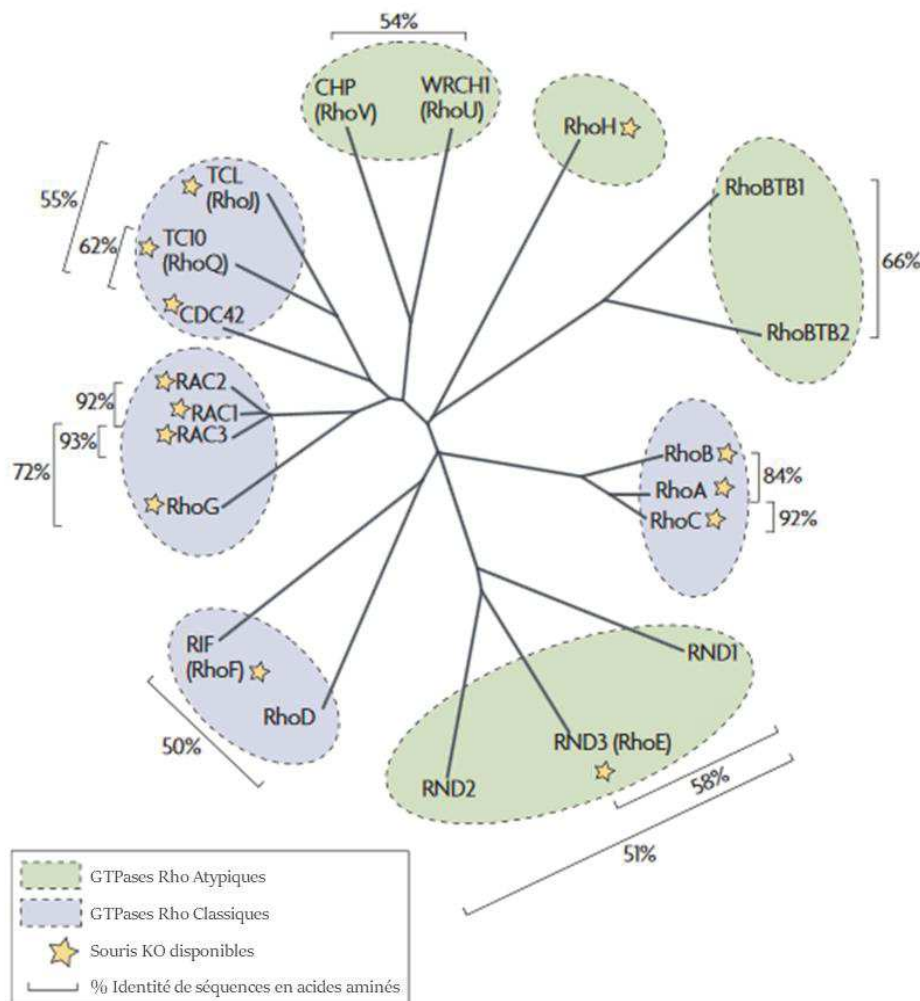


Figure 1 : Arbre phylogénétique de la famille des GTPases Rho. Représentation de l'arbre phylogénétique des GTPases Rho basé sur l'alignement des séquences en acides aminés des 20 membres de la famille Rho réparties en 8 sous-familles. Parmi les GTPases, sont distinguées les GTPases « classiques » (violet) et les GTPases « atypiques » (vert). Les GTPases pour lesquelles une souris knock-out (KO) existe sont annotées d'une étoile. Les pourcentages d'identité de séquence en acides aminés entre les membres sont indiqués pour chaque sous-famille. (D'après Heasman and Ridley, 2008)

I.1.2. Structure des GTPases Rho

Les membres de cette famille sont tous composés d'un domaine spécifique de 12 acides aminés, «Rho insert domain », présent uniquement dans la structure des GTPases Rho (Freeman et al., 1996) (Figure 2). Ce domaine intervient dans l'interaction avec les GEF et dans la liaison et l'activation de certains effecteurs (Schaefer et al., 2014). En N-terminal, les Rho GTPases possèdent le domaine P-loop (Phosphate-binding loop) permettant la liaison au nucléotide et au Magnésium (Mg^{2+}), ainsi que les régions switch I et switch II impliquées

dans la liaison aux régulateurs et effecteurs (Wennerberg and Der, 2004). Les différences majeures entre les Rho se situent principalement dans la région hypervariable en C-terminal.

Les protéines Rho subissent fréquemment des modifications post-traductionnelles dans leur partie C-terminale par l'addition de groupements prénylés au niveau de leur séquence consensus CAAX (C : Cystéine, A : acide aminé aliphatique, X : acide aminé quelconque). Le groupement lipidique peut être un groupement farnésyl si X est une méthionine, ou géranyl-géranyl si X est une leucine (Tableau 1) (Wennerberg et al., 2005). De plus, certaines Rho sont palmitoylés en amont de la séquence CAAX. Ces modifications lipidiques en C-terminale des GTPases Rho sont importantes pour leur adressage aux localisations subcellulaires appropriées pour assurer leurs fonctions (Wennerberg and Der, 2004).

	P-loop	Switch I	
Rac1	-MQAI--KCVVGD G AVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWD		57
Cdc42	-MQTI--KCVVGD G AVGKTCLLISYTTNKFSEYVPTVFDNYAVTMIGGEPYTLGLFD		57
RhoA	-MAAIRKKLVIVGD G ACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWD		59
	Switch II		
Rac1	TAGQEDYDRLRPLSYPQTDVFLICFSLVSPASFENVRAKWYPEVRHHCP-NTPIILVGTK		116
Cdc42	TAGQEDYDRLRPLSYPQTDVFLVCFVSVSPSSFENVKEKWVPEITHHCP-KTPFLLVGTTQ		116
RhoA	TAGQEDYDRLRPLSYPQTDVILMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFCP-NVPIILVGNK		118
	Rho insert domain		
Rac1	LDLRD DKDTIEKLKEKKL TPITYPQGLAMAKEIGAVKYLECSALTQRLKTVFDEAIRAV		176
Cdc42	IDLRD DPSTIEKLAKNKQ KPITPETAELARDLKAVKYVECSALTQRLKKNVFDEAILAA		176
RhoA	KDLRN DEHTRRELAKMKQ EPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAA		178
	Boîte CAAX		
Rac1	LCPPP VKKR ----- KRK CLLL		192
Cdc42	LEPPETQP----- KRK CCIF		191
RhoA	LQARR GKK ----- KSG CLVL		193

Figure 2 : Alignement des séquences primaires des protéines Rac1, Cdc42 et RhoA. Les boîtes grisées indiquent, respectivement, le domaine P-loop, les régions switch I et II et la boîte CAAX. Le « Rho insert domain », absent chez les autres membres de la superfamille Ras, est marqué en gras (D'après Fueller and Kubatzky, 2008).

I.1.3. Régulation des GTPases Rho « classiques »

Les protéines Rho sont des interrupteurs moléculaires cyclant entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP (Figure 3). Le passage entre ces deux formes est régulé par différentes protéines. Le processus d'activation correspond à l'échange du GDP par le GTP, stimulé par des « Guanine Exchange Factors » (GEF). Le GEF se lie à la GTPase active et

catalyse la libération du GDP. La concentration cellulaire en GTP étant supérieure à celle en GDP, c'est le GTP qui est préférentiellement lié sur la GTPase, formant ainsi la forme active. En effet, la liaison au GTP entraîne un changement conformationnel des protéines permettant ainsi leur association avec des effecteurs induisant des effets biologiques. Le retour des Rho à l'état inactif ne se déroule pas par un échange de nucléotides mais par l'hydrolyse du GTP lié par des « GTPases Activating Proteins » (GAP). Les protéines Rho « classiques » interagissent également avec des « GDP Dissociation Inhibitors » (GDI) menant à leur séquestration dans le cytoplasme. Ceci entraîne l'inhibition de l'activation des GTPases mais également permet de prévenir leur dégradation (Garcia-Mata et al., 2011).

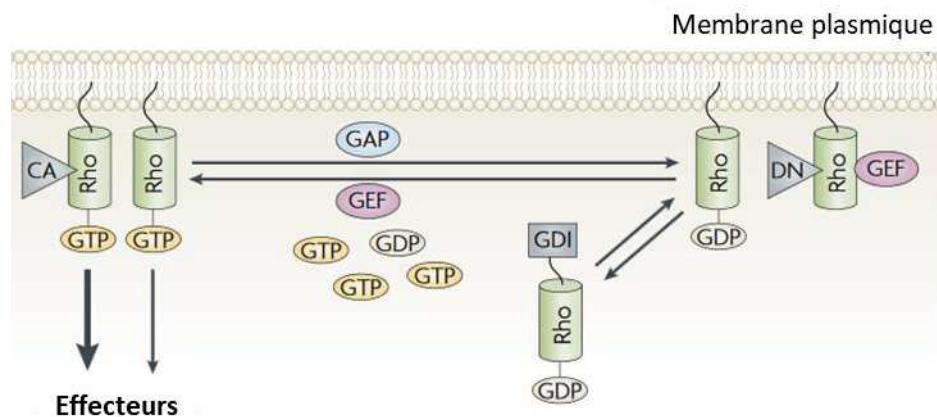


Figure 3 : Cycle d'activation/inactivation des GTPases Rho « classiques ». Les Rho alternent entre un état inactif (lié au GDP) et un état actif (lié au GTP). Sous conformation active, les GTPases interagissent avec les protéines effectrices pour induire des fonctions cellulaires spécifiques. Leur activité est augmentée par des GEF stimulant l'échange du GDP par le GTP et peut être inhibée par des GAP permettant l'hydrolyse du GTP. Les mutations activatrices Q63L et G14V de RhoA/B/C et Q61L et G12V de Rac/Cdc42 inhibent l'activité d'hydrolyse du GTP. Ces mutants sont constitutivement actifs (CA) car ils ne sont pas sensibles à la régulation par les GAP, et provoquent ainsi une signalisation constante aux protéines effectrices. Les mutations inhibitrices T19N et T17N, de RhoA/B/C et de Rac/Cdc42 respectivement, augmentent l'affinité pour les GEF endogènes mais inhibent les interactions avec les effecteurs. Ces mutants fonctionnent comme des dominants négatifs (DN) pour la GTPase en piégeant les GEF endogènes dans un complexe inactif. Les GTPases Rho sont maintenues sous conformation inactive par liaison aux GDI (D'après Heasman and Ridley, 2008).

I.1.4. Fonctions biologiques des GTPases Rho

I.1.4.1 Fonctions classiques

Dans les années 1990, les GTPases Rho ont d'abord été décrites pour leurs rôles sur la morphologie cellulaire et la régulation du cytosquelette d'actine (Figure 4). L'activation de RhoA aboutit à la formation de filaments d'actine appelés fibres de stress. Rac1 favorise la formation de lamellipodes correspondant à des protrusions membranaires riches en actine. Cdc42 induit la formation de fines extensions membranaires riches en actine nommées filopodes (Nobes and Hall, 1995). Les protéines Rho sont également impliquées dans différents processus cellulaires dépendants du cytosquelette d'actine incluant, la polarité

cellulaire, la migration et le trafic vésiculaire exo- et endocytaire (Jaffe and Hall, 2005; Ridley, 2015). De plus, les protéines Rho exercent des fonctions indépendantes du cytosquelette d'actine comme la régulation de la dynamique des microtubules, du cycle cellulaire, de la transcription de gènes et de la balance survie cellulaire/apoptose (Jaffe and Hall, 2005).

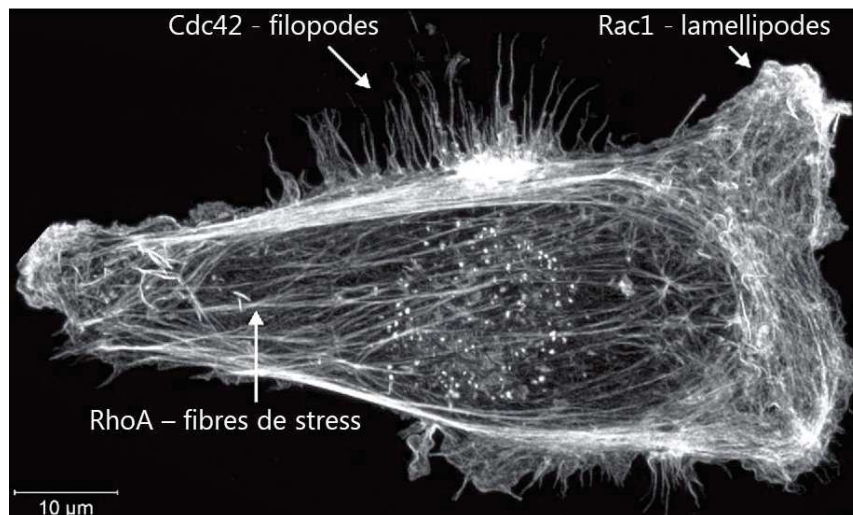


Figure 4 : Effets de RhoA, Rac1 et Cdc42 dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Marquage fluorescent de l'actine filamenteuse dans des cellules tumorales mammaires, MDA MB 231. Les activations de RhoA, Rac1 et Cdc42 induisent respectivement la formation de fibres de stress, lamellipodes et filopodes (D'après Olson, 2016).

De part ces différentes fonctions, les GTPases Rho ont un rôle important dans l'initiation et la progression tumorale. L'expression et/ou l'activité des GTPases Rho est fréquemment perturbée dans les cancers. Différentes GTPases Rho comme RhoA, RhoC, Rac1, Rac2, Rac3 et Cdc42 sont surexprimées dans certains types de tumeurs humaines. A l'inverse, l'expression de certaines Rho, comme RhoB et RND3, est généralement diminuée dans les cancers (Haga and Ridley, 2016; Lin and Zheng, 2015). Il était admis jusqu'à présent que les GTPases Rho étaient très rarement mutées dans les tumeurs à l'exception de RhoH, mutée dans certains lymphomes diffus à grandes cellules B. Cependant, des études récentes utilisant une méthode de séquençage à haut débit de l'exome ont permis d'identifier des mutations d'autres GTPases Rho, notamment de Rac1 et RhoA, dans les tumeurs (Porter et al., 2016).

Plus récemment, plusieurs GTPases Rho ont été identifiées comme gènes de réponse au stress. Cette fonction, à laquelle ce travail s'intéresse plus particulièrement, sera développée dans le paragraphe suivant (Cf. partie I.1.4.2).

Les principaux effecteurs des GTPases Rho et leurs fonctions biologiques associées sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Récapitulatif des effecteurs majeurs, fonctions cellulaires, implications dans les cancers, localisations et modifications lipidiques des GTPases Rho

	RhoGTPases	Effecteurs majeurs	Fonctions cellulaires	Cancers	Localisation	Modifications lipidiques
Rho	RhoA	ROCK1/II mDia1/2 Citron	- Fibres de stress - Stabilité microtubules - Cytokinèse - Adhésion cellulaire - Inhibition croissance neuritique - Migration cellulaire	- Transformation et invasion cellulaire - Surexprimée dans les tumeurs - Mutée dans certains cancers	MP Cytosol Noyau	GG
	RhoB	mDia1 PRK1 PP2A	- Fibres de stress - Adhésion cellulaire - Trafic vésiculaire	- Favorise la réponse aux stress - Inhibition invasion tumorale - Régulée négativement dans les tumeurs	MP Endosomes	GG/F/P
	RhoC	ROCK mDia1 Citron	- Fibres de stress - Adhésion cellulaire	- Transformation et invasion cellulaire - Surexprimée dans les tumeurs	MP Cytosol	GG
Rac	Rac1	WAVE/ARP2/3 PAK1-3 mDia2 Tiam-1	- Lamellipodes - Phagocytose - Activation NADPH oxydase - Adhésion cellulaire - Migration cellulaire	- Favorise la réponse aux stress - Transformation et invasion cellulaire - Surexprimée et mutée dans les cancers	MP Cytosol Noyau	GG
	Rac2		- Lamellipodes	- Surexprimée dans les tumeurs	MP Cytosol	GG
	Rac3		- Lamellipodes	- Transformation et invasion cellulaire - Hyperactive ou surexprimée dans les cancers du sein	MP Endo-membranes	GG
	RhoG	ELMO Kinectine	- Lamellipodes - Migration cellulaire		MP Endosomes Mitochondrie	GG
Cdc42	Cdc42	N-WASP /ARP2/3 mDia2 IRSp53	- Filopodes - Trafic vésiculaire - Polarité cellulaire - Migration cellulaire	- Effet pro ou anti-tumoral	MP Golgi	GG,P
	RhoQ/TC10	PAR6/PKC /PAR3 PAK	- Filopodes	- Transformation cellulaire	MP Péri-nucéaire Endosomes	GG/F

	RhoJ/TCL		- Filopodes - Adhésion cellulaire - Fibres de stress		MP Endosomes	GG/F
Rho U/V	RhoU		- Filopodes - Progression du cycle cellulaire	- Transformation cellulaire	MP Endo-membranes	P
	RhoV		- Filopodes - Progression du cycle cellulaire	- Transformation cellulaire - Surexprimée dans les tumeurs	MP Endo-membranes	P
RhoD/F	RhoD	WHAMM mDia3C	- Filopodes - Trafic vésiculaire - Déstabilisation fibres de stress		MP Endosomes	GG
	RhoF	mDia1 et 2	- Filopodes - Fibres de stress	- Surexprimée dans le lymphome B diffus à grandes cellules	MP	GG
RND	RND1	p190RhoGAP Plexines A1 et B1 socius	- Déstabilisation des fibres de stress - Adhérence cellulaire - Extension neuritique	- Effet pro ou anti-tumoral	MP	F
	RND2	Pragmine Rapostline	- Extension neuritique		Endosomes Cytosol	F
	RND3/RhoE	ROCK p190RhoGAP socius Plexine B2	- Déstabilisation des fibres de stress - Adhérence cellulaire - Extension neuritique - Polarité et migration cellulaire	- Inhibition prolifération et transformation cellulaire - Régulée négativement dans les tumeurs	MP Cytosol Golgi	F
RhoH	RhoH		- Régulation négative de l'activation de Rac1	- Mutée dans le lymphome B diffus à grandes cellules	Endo-membranes	F
RhoBTB	RhoBTB1		- Transport vésiculaire - Prolifération cellulaire et apoptose		Vésiculaire	aucune
	RhoBTB2		- Transport vésiculaire - Prolifération cellulaire et apoptose		Vésiculaire	aucune

GG : Géranylgéranlylation, F : Farnésylation, P : Palmitoylation, MP : Membrane plasmique (D'après Dubash et al., 2011; Etienne-Manneville and Hall, 2002; Heasman and Ridley, 2008; Jaffe and Hall, 2005; Porter et al., 2016; Ridley, 2013, 2015; Riou et al., 2010; Roberts et al., 2008; Sandrock et al., 2010; Vega and Ridley, 2008).

I.1.4.2 Rôle dans la réponse aux génotoxiques et à l'hypoxie

Au sein des gènes de réponse au stress, il faut distinguer deux groupes. Le premier correspond aux gènes qui sont activés de façon précoce après un dommage (dès quelques minutes). Ces gènes sont spécifiques de la réponse aux dommages. Le second groupe correspond aux gènes induits tardivement après un dommage (plusieurs heures, jours). Dans ce cas, leur induction peut alors être secondaire à l'activation des mécanismes cellulaires de réponse aux dommages.

1. Gènes de réponse précoce aux génotoxiques et à l'hypoxie

- RhoB

Parmi les gènes de réponse précoce, le rôle de RhoB a été le mieux caractérisé. En effet, RhoB est induite et/ou activée par différents agents endommagent l'ADN tels que les radiations UV (Canguilhem et al., 2005; Fritz and Kaina, 1997, 2001; Fritz et al., 1995; Glorian et al., 2011; Wang et al., 2014), le cisplatine, l'hydroxyurée, les agents alkylants MNU (N-méthyl-N-nitrosourée) et MMS (méthanesulfonate de méthyle) (Fritz and Kaina, 1997; Fritz et al., 1995), H₂O₂ (Fritz and Kaina, 1997; Srougi and Burrridge, 2011), les radiations ionisantes (IR) (Ader et al., 2003; Ader et al., 2002; Monferran et al., 2008; Srougi and Burrridge, 2011) et la camptothécine (CPT) (Mamouni et al., 2014).

Différents mécanismes d'induction de RhoB en réponse aux dommages ont été identifiés. Il a tout d'abord été montré que les radiations UV augmentent l'activité du promoteur de RhoB (Fritz and Kaina, 2001). Par ailleurs, les UV augmentent la traduction de RhoB en inhibant la liaison de la protéine HuR (Human Antigen R) et du microRNA miR-19 sur la région 3'UTR (untranslated region) de l'ARNm de RhoB (Glorian et al., 2011). Une étude du laboratoire a montré que la CPT augmente la stabilité de l'ARNm de RhoB dans les cellules U2OS, par liaison avec HuR activée par Chk2 (Mamouni et al., 2014). Dans les cellules HeLa, RhoB est augmentée suite à une dégradation de l'ubiquitine ligase E3 Smurf1, induite par la voie ATR/Chk1, activée par les radiations UV (Wang et al., 2014).

Dans différentes études, il a été décrit que RhoB participait à la résistance aux génotoxiques. La surexpression de RhoB augmente la résistance des kératinocytes aux UV (Canguilhem et al., 2005; Meyer et al., 2014). En réponse aux IR, il a été montré que l'induction de RhoB induit une radiorésistance des cellules HeLa et U87 par inhibition de la mort cellulaire post mitotique (Ader et al., 2003; Ader et al., 2002; Monferran et al., 2008).

L'inhibition de RhoB sensibilise les cellules MEF (Mouse embryonic fibroblast) à la CPT en inhibant la réparation des cassures double-brin (DSB) par recombinaison homologue (HR). Il a été proposé que RhoB favorise la réparation via la déphosphorylation de γ H2AX par la phosphatase PP2A (Protein phosphatase 2) (Mamouni et al., 2014). Cependant, d'autres travaux font part du rôle de RhoB dans la sensibilité aux génotoxiques. Dans les cellules HeLa, l'induction de RhoB induite par les UV entraîne une augmentation de l'apoptose (Wang et al., 2014). Dans le cancer du sein, l'inhibition de RhoB entraîne la radiorésistance des cellules (Srougi and Burrridge, 2011). Ainsi, la fonction de l'augmentation de RhoB sous stress génotoxique reste controversée.

RhoB est également activée par des stress non génotoxiques comme l'hypoxie. L'inhibition de RhoB dans les cellules U87 induit la dégradation de HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor-1 α) par le protéasome et la diminution de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α , qui est un facteur impliqué dans l'angiogenèse et la prolifération et induit par l'hypoxie (Skuli et al., 2006).

- Autres GTPases Rho

En dehors de RhoB, Les GTPases Rac1, RhoA et Cdc42 sont également des gènes précoces aux génotoxiques ou à l'hypoxie.

La GTPase Rac1 est également induite précocement en réponse aux traitements par les UV (Espinha et al., 2015) et les IR (Espinha et al., 2015; Yan et al., 2012). L'inhibition de Rac1 par des inhibiteurs pharmacologiques (NSC23766 ou EHT1864) ou par KO sensibilise les cellules aux traitements. De plus, l'inhibition de Rac1 inhibe l'activation des signalisations ATM (ataxia telangiectasia mutated) et ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) et la phosphorylation de γ H2AX induites par les UV et les IR. Ceci entraîne l'accumulation de DSB et l'hypersensibilité des cellules aux UV et IR (Deshmukh et al., 2017; Espinha et al., 2015; Yan et al., 2012). En réponse aux inhibiteurs de topoisomérase II (Top2) : l'étoposide et la doxorubicine, l'inhibition de Rac1 diminue également la phosphorylation de γ H2AX (Huelsenbeck et al., 2012). Cependant, comme RhoB, le rôle de Rac1 dans la sensibilité aux génotoxiques est controversé. En effet, l'inhibition de Rac1 par EHT1864 augmente la résistance de cellules d'hépatomes aux inhibiteurs de Top2, notamment en inhibant la formation de DSB et en diminuant l'interaction de Top2 avec ses poisons (Wartlick et al., 2013). Ce mécanisme nécessite la translocation de Rac1 dans le noyau afin d'induire la phosphorylation de la Top2 (Wartlick et al., 2013).

RhoA jouerait préférentiellement un rôle dans la résistance aux génotoxiques. RhoA est surexprimée dans les lignées de cancers colorectaux, SW620 et LoVo, résistantes à l'irinotécan. L'inhibition de RhoA par siRNA (small interfering RNA) dans ces cellules rétablit leur sensibilité à l'irinotécan en augmentant l'apoptose (Ruihua et al., 2016). L'expression du dominant négatif N19 de RhoA dans la lignée de mélanome métastatique Mewo sensibilise les cellules aux UV A, B et C notamment en augmentant la formation de DSB (Espinha et al., 2016). Dans les cellules HeLa, la modulation de l'expression de RhoA, par transfection du dominant négatif N19 ou du mutant constitutivement actif V14, augmente l'apoptose induite par les UVC ou par de fortes doses de IR (Osaki et al., 2016). Par ailleurs dans les cellules HeLa parentales, RhoA est activée en réponse aux IR (Osaki et al., 2016). Bien que RhoA soit majoritairement présent à la membrane plasmique et dans le cytosol, une étude a montré que les IR augmentent l'activation de RhoA située dans le noyau des cellules HEK293 et n'a pas d'effet sur l'activité de RhoA localisée dans le cytosol (Dubash et al., 2011). L'activation de RhoA par les IR dépend de l'induction de l'activité de la GEF de RhoA, Net1, préférentiellement située dans le noyau.

Au contraire de RhoA, Cdc42 aurait un rôle dans la sensibilisation des cellules aux UV. Les radiations UV activent la GTPase Cdc42 dans les cellules HeLa à des temps courts (Ascer et al., 2015). L'expression du mutant constitutivement actif V12 de Cdc42 entraîne l'inhibition de la phosphorylation de γ H2AX, et par conséquent une déficience dans la signalisation des dommages. Ainsi, Cdc42 permet d'augmenter la sensibilité des cellules aux UV.

2. Gènes de réponse tardive aux génotoxiques

RND3 est un gène de réponse tardive aux stress tels que les UVB, la CPT, l'étoposide (ETP), mitomycine C (MMC) et le cisplatine (Boswell et al., 2007; Ongusaha et al., 2006). L'augmentation de l'ARNm de RND3 en réponse aux cytotoxiques CPT, ETP et MMC dépend de p53 impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN (Ongusaha et al., 2006). En revanche, l'induction de la forme protéique de RND3 par les UVB est indépendante de p53 (Boswell et al., 2007). L'inhibition de RND3 par siRNA augmente l'apoptose induite par la CPT ou l'ETP dans les cellules U2OS (Ongusaha et al., 2006) ou par radiation UVB dans les kératinocytes (Boswell et al., 2007). Cependant, l'inhibition de RND3 par siRNA inhibe l'apoptose induite par le cisplatine ou la doxorubine dans les lignées d'hépatocarcinome BEL-

7402 et MHCC-97L (Ma et al., 2016). Ainsi, ces données révèlent le rôle incertain de RND3 dans la sensibilité cellulaire en réponse aux génotoxiques.

La GTPase RhoC est également induite par le cisplatine après 24 heures de traitement dans les cellules MCF-7 et HCT116. L'induction de RhoC dépend de p53 (Croft et al., 2011).

L'induction de RND1 a également été observée en réponse à différents stress. Ces effets sont décrits dans le paragraphe I.2.3.1.

Les données des différentes études menées sur le rôle des GTPases Rho dans la réponse au stress sont retranscrites dans le tableau 2.

Tableau 2 : Mécanismes et effets biologiques médiés par les GTPases Rho suite à un dommage (stress génotoxiques et hypoxie)

GTPases Rho	Stress	Induction	Temps	Modèle	Mécanismes de l'induction et/ou Conséquences biologiques	Ref
RhoB	UV	↗ ARNm ↗ Protéine	30 min	NIH3T3	↗ RhoB par ↗ de l'activité du promoteur	1,2,3
		↗ ARNm ↗ Protéine ↗ Forme active	30 min - 4h 1 h - 8 h 5 min - 2 h	kératinocytes	↗ RhoB → résistance aux UV par inhibition de l'apoptose	4,5
		↗ ARNm	30 min - 2 h	NIH3T3	Stabilisation de RhoB par HuR	6
		↗ Protéine	2 h - 6 h	HeLa	↗ RhoB → ↗ apoptose induite par les UV	7
		↗ Protéine	8h	HaCat	↗ Traduction de RhoB par inhibition liaisons HuR et miR-19	8
	IR			HeLa, U87	↗ RhoB → radiorésistance <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	9,10
		↗ Forme active	30 min	U87, SF763	↗ RhoB → ↘ mort cellulaire post-mitotique induite par les IR	11
			15 min	MCF-7	↘ RhoB → radiorésistance aux IR par inhibition de l'apoptose	12
	H2O2	↗ Forme active	20 min	Hela	↗ RhoB par ↗ de l'activité du promoteur	3,12
	CPT	↗ ARNm ↗ Protéine ↗ Forme active	1 - 2 h	U2OS	Stabilisation de l'ARNm RhoB par HuR ↗ RhoB → réparation des DSB par HR → résistance des cellules au traitement	13
	Cisplatine	↗ ARNm	30 min	NIH3T3		1
	MNU	↗ ARNm	30 min	NIH3T3		1
	Hydroxyurée	↗ ARNm	30 min	NIH3T3		1
	MMS	↗ Activité du promoteur	30 min	NIH3T3		3

	Hypoxie	↗ Forme active	30 min - 1, 2, 16 h	U87	↘ RhoB → dégradation par le protéasome et ↘ de l'activité transcriptionnelle du facteur HIF-1α induit par l'hypoxie	14
		↗ ARNm ↗ Protéine ↗ Forme active	1, 2, 4 h	HPASMC HPAEC		15
Rac1	IR	↗ Forme active	5 - 30 min	MCF-7	Inhibition de Rac1 (pharmacologique ou expression DN) → radiosensibilisation et ↘ activation des signalisations ATM et ATR induit par les IR	16
				CD18/HPAF	Inhibition de Rac1 (pharmacologique ou expression DN) → radiosensibilisation par ↗ de l'apoptose	17
		↗ Forme active	1 h	HeLa	Expression de Rac1 DN → sensibilisation des cellules au traitement, ↘ phosphorylation de γH2AX induit par les IR ou UV	18
	UV A, B et C	↗ Forme active	1 h	HeLa		
				Kératinocytes	KO de Rac1 → inhibition de la réponse aux dommages à l'ADN induite par les UV	19
	Etoposide / Doxorubicine			Cardiomyoblastes de rat	Inhibition pharmacologique de Rac1 → ↘ phosphorylation de γH2AX et ↘ formation de DSB induits par l'étoposide ou la doxorubicine	20
				Cellules d'hépatome	Inhibition pharmacologique de Rac1 → résistance à la doxorubicine et à l'étoposide, notamment en inhibant la formation de DSB → inhibition de la phosphorylation de Top2 et de p53 induit par la doxorubicine	21
	Doxorubicine			Foies de souris	KO de Rac1 → ↘ phosphorylation de γH2AX induit par la doxorubicine	22
	Hypoxie	↗ Protéine	2, 4, 6 h	Caki-1		23
RhoA	Irinotécan			SW620, LoVo	RhoA est surexprimée dans les lignées résistantes à l'irinotécan. La sensibilité des cellules est rétablie par l'inhibition de RhoA	24
	UV A, B et C			MeWo	↘ RhoA → sensibilisation aux UV notamment en augmentant la formation de DSB	25
	UV C			HeLa	Modulation de RhoA (DN ou CA) → ↗ apoptose induite par les UV	26
	IR	↗ Forme active	?	HeLa	Modulation de RhoA (DN ou CA) → ↗ apoptose induite par les IR	26

			1 h	HEK293	RhoA est activée uniquement dans le noyau par les RI via l'activation de sa GEF, Net1	27
	Hypoxie	$\nearrow$ ARNm $\nearrow$ Protéine $\nearrow$ Forme active	2 h 3, 4, 6 h 2, 3, 4 h	Caki-1		23
		$\nearrow$ Forme active	1, 2, 4 h	HPASMC HPAEC		15
Cdc42	UV	Forme active	30 min - 1 h	HeLa	Expression CA de Cdc42 $\rightarrow$ $\searrow$ phosphorylation de γ H2AX et sensibilisation aux UV	28
	Hypoxie	Protéine Forme active	1 - 2 h	Caki-1		23
RND3	CPT	ARNm Protéine	24 -48 h 24 h	U2OS	$\searrow$ RND3 $\nearrow$ apoptose des cellules U2OS induite par la CPT	29
	Etoposide	ARNm	12 - 24 h	MCF-7, IMR90	$\searrow$ RND3 $\nearrow$ apoptose des cellules U2OS induite par l'étoposide	29
	MMC	ARNm	12 - 24 h	HCT116		29
	UVB	Protéine	16 h	Kératinocytes	$\searrow$ RND3 $\nearrow$ apoptose dans les kératinocytes induite par les UVB	30
	Cisplatine	ARNm	24 h	HCT116, MCF-7		31
	Cisplatine/ Doxorubicine			BEL-7402 MHCC-97L	$\searrow$ RND3 $\searrow$ apoptose dans cellules d'hépatocarcinome induite par le cisplatine ou la doxorubicine	32
	Hypoxie	ARNm Protéine	6 - 24 h	AGS	$\searrow$ RND3 $\rightarrow$ $\nearrow$ E-cadherine $\rightarrow$ $\searrow$ invasion induite par l'hypoxie	33
RhoC	Cisplatine	ARNm	24 h	HCT116, MCF-7		31
RhoJ	Cisplatine			SK-Mel-28 MNT-1	$\nearrow$ RhoJ $\rightarrow$ $\nearrow$ PAK1 $\rightarrow$ inhibition activation ATR $\rightarrow$ $\nearrow$ SOX10 $\rightarrow$ Résistance au cisplatine	34
RND2	Cisplatine			SK-Mel-28 MNT-1	$\searrow$ RND2 $\rightarrow$ sensibilisation au cisplatine	34

IR : radiations ionisantes, CPT : camptothécine, MNU : N-méthyl-N-nitrosourée, MMS : méthanesulfonate de méthyle, MMC : mitomycine C, DSB : DNA double strand break.

Lignées cellulaires : NIH3T3 (fibroblastes murins) ; HeLa (adénocarcinome du col de l'utérus) ; HaCat (kératinocytes) ; U87 (glioblastome) ; SF763 (astrocytome) ; MCF-7 (adénocarcinome mammaire) ; U2OS (ostéosarcome) ; HPASMC, HPAEC (cellules de l'artère pulmonaire) ; CD18/HPAF (adénocarcinome pancréatique) ; Caki-1 (carcinome rénal) ; SW620, LoVo, HCT116 (carcinome du colon) ; MeWo, SK-Mel-28, MNT-1 (mélanome) ; HEK293 (cellules rénales embryonnaires) ; IMR90 (Fibroblastes pulmonaires) ; BEL-7402, MHCC-97L (Hépatocarcinome) ; AGS (Adénocarcinome gastrique)

(1) (Fritz et al., 1995), (2) (Fritz and Kaina, 2001), (3) (Fritz and Kaina, 1997), (4) (Canguilhem et al., 2005), (5) (Meyer et al., 2014), (6) (Westmark et al., 2005), (7) (Wang et al., 2014), (8) (Glorian et al., 2011), (9) (Ader et al., 2002), (10) (Ader et al., 2003), (11) (Monferran et al., 2008), (12) (Srougi and Burridge, 2011), (13) (Mamouni et al., 2014), (14) (Skuli et al., 2006), (15) (Wojciak-Stothard et al., 2012), (16) (Yan et al., 2012), (17) (Yan et al., 2014), (18) (Espinha et al., 2015), (19) (Deshmukh et al., 2017), (20) (Huelsenbeck et al., 2012), (21) (Wartlick et al., 2013), (22) (Bopp et al., 2013), (23) (Turcotte et al., 2003), (24) (Ruihua et al., 2016), (25) (Espinha et al., 2016), (26) (Osaki et al., 2016), (27) (Dubash et al., 2011), (28) (Ascer et al., 2015), (29) (Ongusaha et al., 2006), (30) (Boswell et al., 2007), (31) (Croft et al., 2011), (32) (Ma et al., 2016), (33) (Zhou et al., 2011), (34) (Ho et al., 2012).

1.2. La GTPase RND1

I.2.1. La famille des RND

I.2.1.1 Identification de la famille RND

RND1/Rho6 appartient au côté de **RND2**/Rho7 et **RND3**/Rho8/RhoE à la sous-famille des RND. RND3 a été la première protéine à être découverte de par sa capacité à interagir avec p190 RhoGAP, GAP de RhoA (Foster et al., 1996). RND1 et RND2 ont par la suite été identifiées par clonage de deux séquences d'ADNc similaires au domaine effecteur de RhoA (Nobes et al., 1998). Le gène RND1 est localisé sur le chromosome 12 (q12-q13), alors que les gènes RND2 et RND3 sont respectivement localisés sur le chromosome 17 (q21) et sur le chromosome 2 (q23.3). Par rapport aux sous-familles RhoA, Rac et Cdc42, les protéines RND1 sont apparues plus récemment au cours de l'évolution et sont exprimées seulement chez les vertébrés (Boureux et al., 2007). Ceci suggère qu'elles seraient impliquées dans des processus biologiques dépendent des vertébrés. De plus, les protéines RND1 du xénope et du rat présentent une identité très forte (86% et 92.57% respectivement) avec la protéine humaine. Le xénope et le rat sont utilisés comme modèles d'étude des fonctions de RND1 (Kim et al., 2003; Wunnenberg-Stapleton et al., 1999)

I.2.1.2 Structure des protéines RND

Les protéines RND partagent entre elles 51 à 58% d'homologie au niveau de leur séquence primaire et 45 à 49% avec les protéines de la sous-famille des Rho (Heasman and Ridley, 2008; Nobes et al., 1998). Comme décrit dans la partie I.1.2., les protéines RND se distinguent des autres Rho car elles sont en permanence sous leur forme active liée au GTP. En effet, trois résidus impliqués dans l'hydrolyse du GTP des protéines Ras diffèrent dans la sous-famille RND. L'identification des mutations activatrices et inactivatrices de Ras aide à la caractérisation de l'activité des GTPases. Dans la séquence de RND1, l'équivalent de la glycine en position 12 de Ras est un résidu valine, alanine ou sérine; ceux des alanines en position 59 et 61 de Ras sont des sérines (Figure 5). Une mutation d'un seul de ces acides aminés confère à la protéine Ras une diminution de son activité GTPasique intrinsèque et prévient l'hydrolyse du GTP par les GAPs, aboutissant à une protéine constitutivement active. Ainsi, les protéines RND sont dépourvues d'activité GTPasique intrinsèque et sont insensibles à la régulation par les RhoGAPs. Par ailleurs, leur affinité avec le GDP est inférieure à celle avec le GTP (Nobes et al., 1998). Les protéines RND diffèrent également des autres Rho par

des extensions en N-terminal de 8 et 18 acides aminées pour RND1 et RND3, respectivement, et en C-terminal de 30 acides aminées (Nobes et al., 1998). En N-terminal, RND1 et RND3 possèdent la séquence KERRA importante pour leur localisation subcellulaire en permettant leur ciblage au niveau des rafts lipidiques (Oinuma et al., 2012). Les protéines RND possèdent une boîte CAAX en C-terminal permettant leur prénylation. Cependant, contrairement aux protéines des sous-familles RhoA, Rac, et Cdc42 qui sont majoritairement geranyl-geranylées, dû à la présence d'un résidu leucine en C-terminal, les protéines RND possèdent un résidu méthionine et sont ainsi farnésylées (Figure 5).

Afin d'étudier les fonctions des GTPases, des mutants constitutivement inactifs sont utilisés comme outils. C'est le cas avec le mutant T27N de RND1 qui correspond à la mutation inhibitrice S17N de Ras, utilisée pour inhiber la fonction de Ras. Cette mutation conduit à un défaut d'interaction de la GTPase avec les protéines effectrices même si elle est liée au GTP (Figure 5) (Nobes et al., 1998).

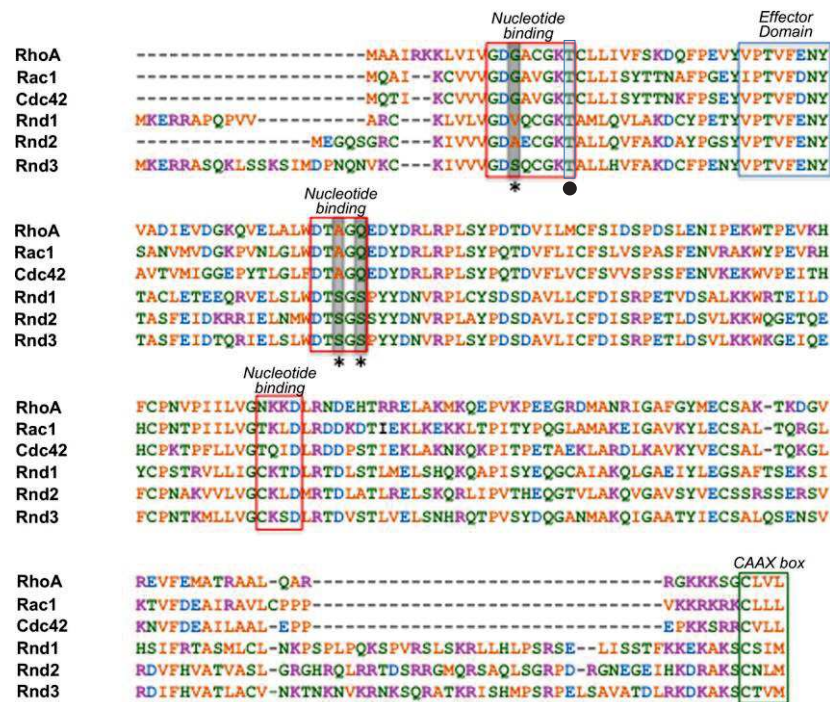


Figure 5 : Alignement de séquences primaires de la famille RND comparées à RhoA, Rac1 et Cdc42. Les domaines de liaisons au GTP ou GDP, le domaine effecteur des Rho et les boîtes CAAX sont encadrés. Les acides aminés clés impliqués dans l'hydrolyse du GTP sont indiqués par une étoile. Le site de mutation inhibitrice correspondant au T27N pour RND1 est indiqué par un rond (D'après Paysan et al., 2016).

I.2.2.Expression et localisation de RND1

I.2.2.1 Expression tissulaire et cellulaire de RND1

Contrairement à RND3 dont l'expression est ubiquitaire, RND1 n'est pas exprimée dans tous les tissus chez l'homme. L'ARNm de RND1 est exprimé dans le cerveau et le foie et est exprimé plus faiblement dans les poumons, le pancréas, le thymus, la prostate, les ovaires et l'intestin grêle. Dans le cerveau, l'ARNm de RND1 est principalement retrouvé dans le cortex cérébral ainsi que dans les lobes occipitaux, temporaux et frontaux. L'ARNm de RND1 est également exprimé dans différents tissus fœtaux tels que le cerveau, les poumons, le foie et les reins (Nobes et al., 1998).

Chez le rat, RND1 est fortement exprimée dans les neurones corticaux et pyramidaux de l'hippocampe pendant l'étape de formations des synapses (Ishikawa et al., 2003). La forme endogène de RND1 a été détectée dans les dendrites et l'axone des neurones d'hippocampe (Ishikawa et al., 2003; Li et al., 2009).

Il a été montré chez le xénope, que l'expression de RND1 varie au cours des différentes étapes de l'embryogénèse. L'ARNm de RND1 est particulièrement exprimée pendant l'étape de gastrulation au niveau de l'ectoderme et de la lèvre dorsale du blastopore. Durant la neurulation, RND1 est exprimée dans le mésoderme somitogénique. A mi-neurula, RND1 est retrouvée dans les somites et dans les cellules formant la crête neurale, puis diminue après la fin de leur formation (Wunnenberg-Stapleton et al., 1999).

L'ARNm de RND1 augmente durant la grossesse chez l'humain et le rat au niveau du myomètre dans l'utérus. Chez le rat, l'expression de RND1 croît jusqu'à atteindre une valeur maximale en fin de gestation (21 jours). Dès un jour post-partum, l'expression de RND1 retombe immédiatement au niveau initial (Kim et al., 2005; Kim et al., 2003).

I.2.2.2 Localisation cellulaire de RND1

Aucun anticorps commercial n'a été rapporté pour reconnaître la forme endogène de RND1 humain. Ainsi, les études sur la localisation de la protéine ont été réalisées dans différents système de transfection d'un plasmide RND1 seul ou étiqueté. Dans ces modèles de surexpression de RND1, il a été observé que la protéine est associée à la membrane plasmique (Kato et al., 2002; Nobes et al., 1998; Wunnenberg-Stapleton et al., 1999).

L'extension en N-terminal est importante pour la localisation de RND1 mais également pour exercer ses fonctions (Oinuma et al., 2012). La séquence KERRA (Lys-Glu-Arg-Arg-Ala) permet la localisation de RND1 dans les rafts lipidiques, à la membrane plasmique (Figure 6). La délétion des sept premiers acides aminés de RND1 en N-terminal entraîne une localisation nucléaire de RND1 (Figure 6).

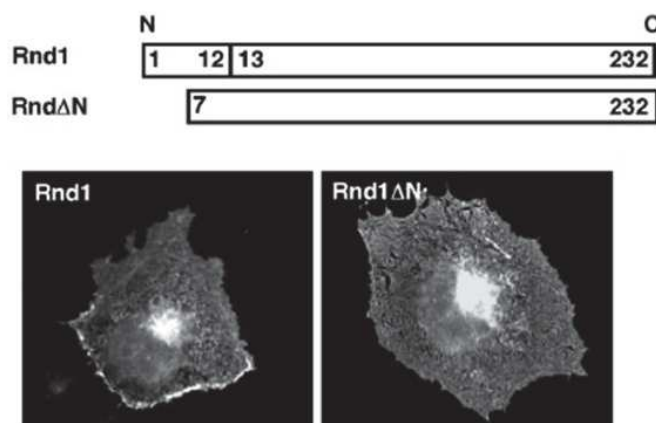


Figure 6 : L'extension de RND1 en N-terminal est importante pour sa localisation membranaire. Les cellules Cos-7 ont été transfectées par les plasmides Rnd1 et Rnd1ΔN (forme tronquée des sept premiers acides aminés) étiquetés Myc (D'après Oinuma et al., 2012).

Par ailleurs, la farnésylation de RND1 est également requise pour sa localisation subcellulaire. Cette modification lipidique post-traductionnelle consiste en l'ajout d'un groupement farnésyl sur la cystéine du motif CAAX à l'extrémité C-terminale. Cette liaison est catalysée par la FTase (Farnésyl Transférase). L'utilisation d'inhibiteurs de FTase (FTI) entraîne une diminution de RND1 à la membrane plasmique ainsi qu'une accumulation de la protéine au niveau cytoplasmique et nucléaire (Figure 7). De plus, la perte du phénotype contracté des cellules lié à l'expression ectopique de RND1 a été observée (Roberts et al., 2008) (Cf. partie I.2.4.1). A l'inverse, l'interaction de RND1 avec la protéine 14-3-3 entraîne sa translocation de la membrane plasmique vers le cytosol. Par conséquent, l'effet de RND1 sur la morphologie de la cellule est inhibé (Cf. partie I.2.4.1). Cette liaison est à la fois dépendante de la phosphorylation de la sérine S228, située près de la boîte CAAX, mais également de la farnésylation (Riou et al., 2013).

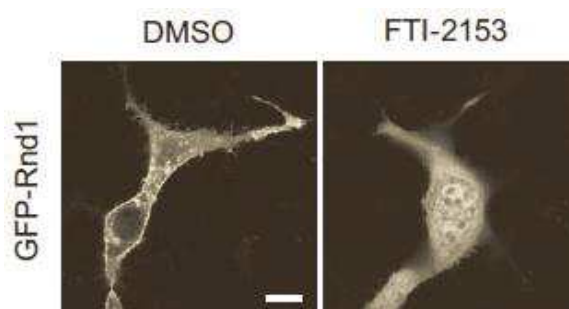


Figure 7 : L'association de RND1 à la membrane plasmique est inhibée par l'ajout de FTI. Les fibroblastes NIH3T3 sont transitoirement transfectés avec un plasmide RND1 couplé à un tag GFP. Les cellules sont traitées avec du DMSO ou 10 μ M de FTI-2153 (D'après Roberts et al., 2008).

I.2.3. Régulation de l'expression de RND1

I.2.3.1 Régulation transcriptionnelle et post transcriptionnelle

RND1 étant toujours sous forme active liée au GTP, elle est principalement régulée par des modifications de son expression.

Régulation par des mécanismes épigénétiques

Les mécanismes épigénétiques régulent l'expression des gènes. Il existe différents marqueurs épigénétiques, dont la méthylation de l'ADN, les modifications des histones ou encore les complexes de remodelage de la chromatine (Allis and Jenuwein, 2016).

Différents travaux ont montré que l'activité transcriptionnelle de RND1 est régulée par des mécanismes épigénétiques. Le co-traitement de différentes lignées de cancer gastrique par un inhibiteur de la méthylation de l'ADN, le 5'AZA-2'Deoxyctidine, et un inhibiteur des histone-désacétylases (HDAC), la TSA (Trichostatine A), entraîne une augmentation de l'ARNm de RND1 (Nishigaki et al., 2005a).

Plus récemment, il a été montré que l'ARNm de RND1 est diminué dans plusieurs lignées cellulaires du cancer du sein par différents mécanismes épigénétiques incluant, la méthylation de l'ADN, l'acétylation des histones et le complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) possédant une activité histone-méthyltransférase (Okada et al., 2015).

Ces résultats suggèrent que l'expression de RND1 est réprimée par des mécanismes épigénétiques dans les cancers.

Régulation par des facteurs de croissance

L'équipe du Pr Giancotti a montré dans les cellules tumorales mammaires MCF-10A que l'ARNm de RND1 est diminué par différents facteurs mitogènes tels que l'EGF, l'insuline,

l'hydrocortisone ou des extraits d'hypophyse bovine (Okada et al., 2015). De plus, l'ARNm de RND1 est diminué par l'ostéoprotégérine (OPG) dans les ostéoclastes (Song et al., 2014). L'OPG est un récepteur de la famille des TNF (Tumor Necrosis Factor) produit par les ostéoblastes afin d'inhiber la résorption osseuse en bloquant la différenciation des ostéoclastes. Ainsi il se pourrait que RND1 joue un rôle dans la résorption osseuse induite par les ostéoclastes.

En outre, l'expression de RND1 est induite par différents facteurs de croissance. Par exemple, l'ARNm de RND1 est augmenté par l'inhibition de contact, la cytokine TGF- β (Transforming growth factor β) ou le facteur de croissance VEGF (Vascular endothelial growth factor) à des temps courts (entre 1h et 2h) (Okada et al., 2015; Suehiro et al., 2014). L'augmentation transcriptionnelle de RND1 par le facteur de croissance VEGF est partiellement reversée par l'ajout de l'immunosuppresseur, cyclosporine A, dans des cellules endothéliales HUVEC. Le VEGF permet d'activer la voie de signalisation Calcineurine-NFAT (nuclear factor of activated T cells) (Suehiro et al., 2014).

Régulation par des facteurs de transcription

A ce jour, deux facteurs de transcription, NFATc1 et Oct4 (Octamer-binding transcription factor 4), ont été identifiés comme régulateurs transcriptionnels de RND1. La liaison de la protéine NFATc1, impliquée dans la réponse immunitaire, au niveau du promoteur et d'une région enhancer distale de RND1 augmente la transcription de RND1 (Suehiro et al., 2014). Par ailleurs, il a été montré dans la lignée cancéreuse humaine MDA-MB231 que le facteur de transcription Oct4 se lie au promoteur de RND1 sur deux sites de liaison (-844 et -1271 pb). Cette liaison entraîne une inhibition de son expression (Shen et al., 2014).

Régulation par le stress et les thérapies anti-cancéreuses

La régulation de l'expression de l'ARNm de RND1 en réponse au stress a principalement été mise en évidence par des approches de criblage sur puces ADN ou ARN. Ainsi, il a été montré que le co-traitement de cellules de leucémie myéloïde chronique par l'imatinib, inhibiteur de l'activité de la tyrosine kinase, et l'amifostine, un antioxydant, deux molécules pro-apoptotiques, induisent l'augmentation du niveau d'ARNm de RND1 (Bianchini et al., 2007). L'ARNm de RND1 est augmenté de façon précoce (15 min) après traitement des cellules de lymphocytes humains par IR (Turtoi et al., 2008). Par ailleurs, l'ARNm de RND1 est augmenté par les UV à des temps plus longs (20h) dans la lignée de cellules épithéliales

mammaires MCF-10A (Okada et al., 2015). Ces résultats suggèrent que RND1 serait un gène de réponse aux génotoxiques.

Régulation par des hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes, l'œstradiol et la progestérone, augmentent le taux d'ARNm de RND1 dans des muscles lisses de rat issus de l'iléum et de l'aorte (Loirand et al., 1999) et dans les cellules musculaires lisses du myomètre chez le rat et l'humain (Kim et al., 2005).

Régulation par de longs ARN non-codant

Les longs ARN non-codants (lncRNA) sont des ARN non traduits en protéines qui régulent l'expression des gènes (Dey et al., 2014). Récemment, le lncRNA AGAP2-AS1 a été identifié en tant que répresseur de RND1 (Li et al., 2016; Qi et al., 2017). L'inhibition de l'expression d'AGAP2-AS1 par siRNA induit l'augmentation de l'ARNm de RND1 dans les cellules du cancer du poumon non à petites cellules H1975 et dans les cellules du cancer gastrique BGC823 (Li et al., 2016; Qi et al., 2017). Une expression élevée d'AGAP2-AS1 dans les cancers du poumon non à petites cellules et les cancers gastriques est associé à la progression tumorale. Ces données suggèrent donc que RND1 aurait une fonction anti-tumorale dans ces cancers.

Régulation par des microRNA

Les microRNA (miR) sont de courts ARN endogènes, non codants, qui régulent l'expression des gènes post-transcriptionnellement. Les miR s'apparient à un ou plusieurs ARNm en général dans leur région 3' non traduite (3'UTR) entraînant leur dégradation ou l'inhibition de leur traduction (Jonas and Izaurralde, 2015). La partie 3'UTR de l'ARNm de RND1 possède un ou plusieurs sites spécifiques de liaison pour le miR-199a-5p. La surexpression de miR-199a-5p dans les cellules urothéliales immortalisées TEU-2 entraîne une diminution de l'ARNm de RND1 (Monastyrskaya et al., 2013). De plus, la surexpression de miR-603 dans les cellules rénales embryonnaires humaines HEK293 et les cellules humaines du cancer du col de l'utérus HeLa diminue l'ARNm de RND1 (Zhang et al., 2016).

I.2.3.2 Régulation post-traductionnelle

- Phosphorylation

Plusieurs GTPases Rho sont régulées par phosphorylation, qui souvent se produit près de la boîte CAAX, modifiant ainsi leur localisation (Hodge and Ridley, 2016).

La liaison de RND1 avec la protéine 14-3-3 induit la translocation de RND1 de la membrane plasmique vers le cytoplasme et inhibe ses effets sur la morphologie cellulaire (Cf. partie I.2.4.1.) (Riou et al., 2013). La liaison de 14-3-3 sur RND1 est similaire à l'action des GDIs sur les GTPases « classiques » en l'extrayant de son site d'action à la membrane plasmique vers le cytoplasme afin de l'empêcher d'interagir avec ses effecteurs. Cependant l'interaction avec 14-3-3 nécessite en amont la phosphorylation de la protéine cible par une kinase. La kinase phosphorylant RND1 n'est pas connue. Par ailleurs, 14-3-3 interagit également avec RND3 après phosphorylation de trois sites différents de celui identifié pour RND1. RND3 est phosphorylé en S210 par PKC (Protein kinase C) ainsi qu'en S218 et S240 par ROCK (Rho-associated protein kinase) (Riou et al., 2013). Il se pourrait que la phosphorylation de RND1 soit régulée par les mêmes protéines que RND3.

- Interaction aux effecteurs

L'interaction de RND1 avec ses effecteurs p190RhoGAP et Syx permet la stabilisation de sa forme protéique (Goh and Manser, 2012).

I.2.4.Fonctions biologiques de RND1

I.2.4.1 Régulation de la morphologie cellulaire et du cytosquelette d'actine

L'effet des RND sur le contrôle du cytosquelette d'actine a été le premier identifié (Nobes et al., 1998). Par ailleurs, ce sont ces observations qui sont à l'origine du nom de la sous-famille RND. En effet, RND vient du mot « round » car la surexpression de RND1 ou RND3 dans des fibroblastes aboutit à un phénotype arrondi des cellules.

Le rôle de RND1 dans la morphologie cellulaire a été étudié dans différents types cellulaires : fibroblastes, cellules épithéliales, neurones. L'expression de RND1 induit la perte des points focaux d'adhérence permettant d'ancrer les cellules à la matrice extracellulaire (MEC). Les cellules ont ainsi tendance à se contracter. Cependant, elles gardent quelques

contacts avec la matrice, ce qui leur confère un phénotype dendritique (Figure 8) (Nobes et al., 1998). Par ailleurs, l'expression ectopique de RND1 induit une diminution des fibres de stress d'actine dans différents modèles cellulaires (Figures 8 A et B). De plus, lorsque l'on induit rapidement la formation de fibres de stress par un traitement avec l'acide lysophosphatidique (LPA) dans des fibroblastes, l'expression ectopique de RND1 permet de prévenir leur formation (Figures 8 C et D) (Nobes et al., 1998). D'autre part, il a été montré que RND1 colocalise avec les protéines cadhérines au niveau des jonctions d'adhérence dans les fibroblastes murins Swiss 3T3 (Nobes et al., 1998).

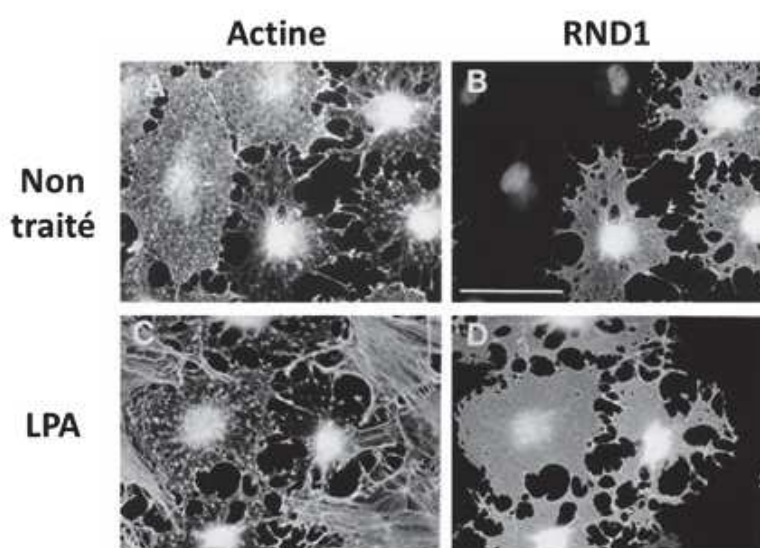


Figure 8 : Effet de la surexpression de RND1 sur la formation des fibres de stress d'actine. Immunomarquage de RND1 (B et D) et des filaments d'actine (A et C) dans des fibroblastes Swiss 3T3 quiescents et confluents, préalablement injectés avec un vecteur exprimant RND1 puis traités ou non par le LPA (100 ng/mL) pendant 30 min (D'après Nobes et al., 1998).

Les effets morphologiques de RND1 sont liés à une inhibition de RhoA via p190RhoGAP, une des plus abondantes GAP de RhoA (Wennerberg et al., 2003). En effet, RND1 peut se lier au niveau du domaine central de p190RhoGAP. Cette interaction va augmenter l'activité GAP de p190, qui a pour conséquence une diminution de RhoA sous sa forme active liée au GTP et ainsi une inhibition de la formation de fibres de stress (Figure 9). Par ailleurs, il a été observé, dans des fibroblastes 3T3, que l'absence de p190RhoGAP entraîne une diminution des effets de l'expression de RND1 sur les fibres de stress et la morphologie de la cellule (Wennerberg et al., 2003). D'autre part, l'effecteur de RhoA « ROCK1 » peut phosphoryler p190RhoGAP et par conséquent diminuer sa liaison à RND1. Ce mécanisme permet à RhoA de prévenir son inhibition par RND1 (Mori et al., 2009).

D'autres partenaires de RND1 pourraient participer à la régulation du cytosquelette d'actine par RND1. En effet, il a été montré que RND1 pouvait se lier à Syx, une GEF de

RhoA (Figure 9). L'effet de cette interaction n'a pas été étudié. Par ailleurs, Syx se lie à RND3. Tout comme RND1, RND3 est connu pour inhiber l'activation de RhoA via son interaction avec p190RhoGAP (Wennerberg et al., 2003). De façon similaire, Goh and Manser ont déterminé que l'inhibition de RhoA-GTP pouvait également résulter de la régulation négative de Syx par RND3 (Goh and Manser, 2010) Il se pourrait donc que la liaison de RND1 avec Syx entraîne le même effet.

Un autre partenaire de RND1, Socius, a été identifié par une technique de double hybride chez la levure en utilisant RND1 comme appât (Katoh et al., 2002). Socius interagit avec RND1 via sa partie C-terminale. Dans des fibroblastes Swiss 3T3, l'expression ectopique de la forme sauvage de Socius n'a pas d'effet sur le cytosquelette d'actine. Néanmoins, l'expression ectopique d'une forme de Socius permettant son adressage à la membrane plasmique (Socius-CAAX), entraîne une perte des fibres de stress. De plus, dans des cellules co-transfectées avec les plasmides Socius-COOH et RND1, l'expression de Socius n'a pas d'effet sur l'inhibition des fibres de stress par RND1 mais il reverse l'effet sur la morphologie cellulaire (Figure 9).

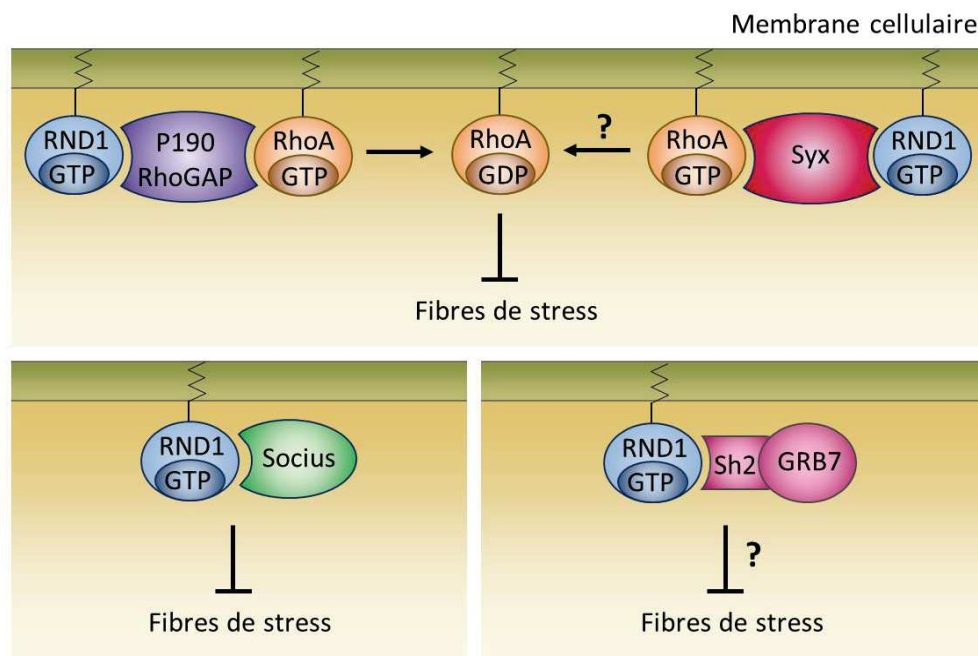


Figure 9 : Schéma récapitulatif des effets de la liaison de RND1 à ses différents effecteurs sur la formation des fibres de stress d'actine (Adapté de Chardin, 2006).

RND1 peut également interagir avec le domaine SH2 de Grb7 (Growth factor receptor-bound protein 7), une protéine appartenant à la famille des protéines adaptatrices impliquées dans la transduction de signal (Vayssiere et al., 2000). L'effet de cette liaison directe n'a pas été étudié. Cependant, cette interaction pourrait contribuer à l'inhibition de la formation des fibres de stress par RND1, puisque Grb7 joue un rôle dans le maintien des filaments d'actines (Figure 9) (Garcia-Palmero and Villalobo, 2013).

I.2.4.2 Formation des connexions nerveuses

La polarité cellulaire, essentielle au développement neuronal, est liée à des modifications du cytosquelette d'actine. Les neurones sont interconnectés au niveau des dendrites, multiples extensions courtes du corps cellulaire, dédiées à la réception des signaux, et les axones, unique prolongement long du neurone, qui véhiculent les signaux reçus aux autres neurones. Le cône de croissance est une structure riche en actine filamenteuse (actine F), située au bout de l'axone en croissance, et qui permet de connecter l'axone au neurone cible (Figure 10). Un réseau de microtubules permet l'expansion du cône de croissance. Les neurites - filopodes et lamellipodes - qui émanent du cône de croissance explorent l'environnement dans toutes les directions (Figure 10). La trajectoire des cônes de croissance est contrôlée par des molécules de guidage dont les principales sont les nétrines, sémaphorines et éphrines. Les cônes de croissance expriment les récepteurs aux molécules de guidage et en fonction des signaux reçus, alternent élongation et rétraction des filopodes et des lamellipodes. Les protéines Rho participent à la formation des connexions nerveuses (Menager and Kaibuchi, 2003; Takano et al., 2015). Les signaux attractifs activent Rac1 et Cdc42 tandis que les signaux répulsifs, activent RhoA. L'activation de Rac1 et de Cdc42 augmente la croissance axonale en induisant la formation de lamellipodes et de filopodes. L'activation de RhoA entraîne la rétraction de ces structures et le collapsus du cône de croissance qui correspond à la rétraction subite avec perte de mobilité.

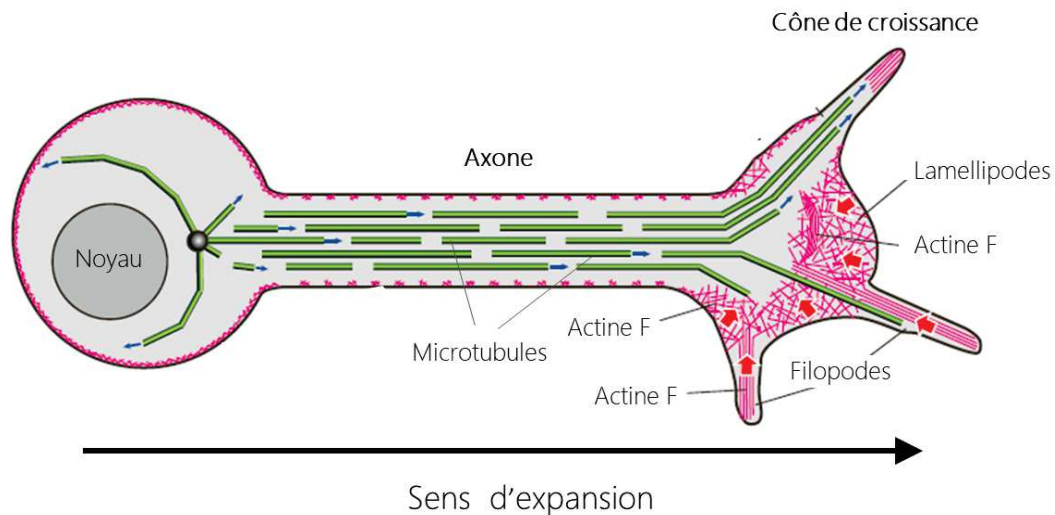


Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation du cytosquelette d'actine dans la polarité neuronale. Distribution et organisation des microtubules et de l'actine filamentaire (actine F) dans l'axone et le cône de croissance d'un neurone en expansion. Le cône de croissance permet l'expansion du neurone vers sa cible en alternant élongation et rétraction des filopodes et lamellipodes (D'après Prokop et al., 2013).

Le rôle de RND1 dans la formation des connexions nerveuses a pour la première fois été décrit dans les cellules PC12 qui dérivent de cellules de phéochromocytome de rat et sont utilisées pour étudier la croissance neuritique (Aoki et al., 2000) et quelques années plus tard dans des neurones d'hippocampe de rats (Ishikawa et al., 2003). Dans ces deux modèles, la surexpression de RND1 initie la formation de protrusions de types neurites, précurseurs des épines dendritiques, à partir de la membrane plasmique. A l'inverse, l'inhibition de RND1 par un ADN antisens aboutit à l'immaturité des épines dendritiques (Ishikawa et al., 2003). Par ailleurs, RND1 participe au collapsus des cônes de croissance induit par les sépharines 3A ou 4D (Oinuma et al., 2004a; Zanata et al., 2002). Enfin RND1 participe à la croissance de l'axone (Li et al., 2009).

Les différents rôles que RND1 exerce dans le contrôle de la polarité neuronale peuvent être expliqués par l'effet de ses interactions avec différents effecteurs, comme les plexines, FRS2 β , STI1 et SCG10, sur la régulation du cytosquelette d'actine et des microtubules.

1. Régulation du cytosquelette d'actine

Les sépharines participent à la croissance du cône axonal et au guidage des axones. Chez les vertébrés, les sépharines sont composées de vingt membres, répartis en cinq classes (de 3 à 7) (Figure 11). Les principaux récepteurs des sépharines sont les plexines,

composées de neuf membres, réparties en quatre classes (de A à D). Ces protéines possèdent un domaine GAP d'activation de l'activité GTPase de petites protéines G. Les plexines de classe B possèdent en plus, un domaine PDZ de liaison avec les GEF. Les sémaphorines de classe 3 (exceptée la 3E) sont sécrétées alors que celles des autres classes sont liées aux membranes. De ce fait, la transmission de signaux par les sémaphorines de classe 3 nécessite la présence d'un co-récepteur, la neuropiline (NRP).

Certaines plexines (A1, B1, B2, B3) possèdent un domaine de liaison permettant leur interaction avec RND1 (McColl et al., 2016; Rohm et al., 2000).

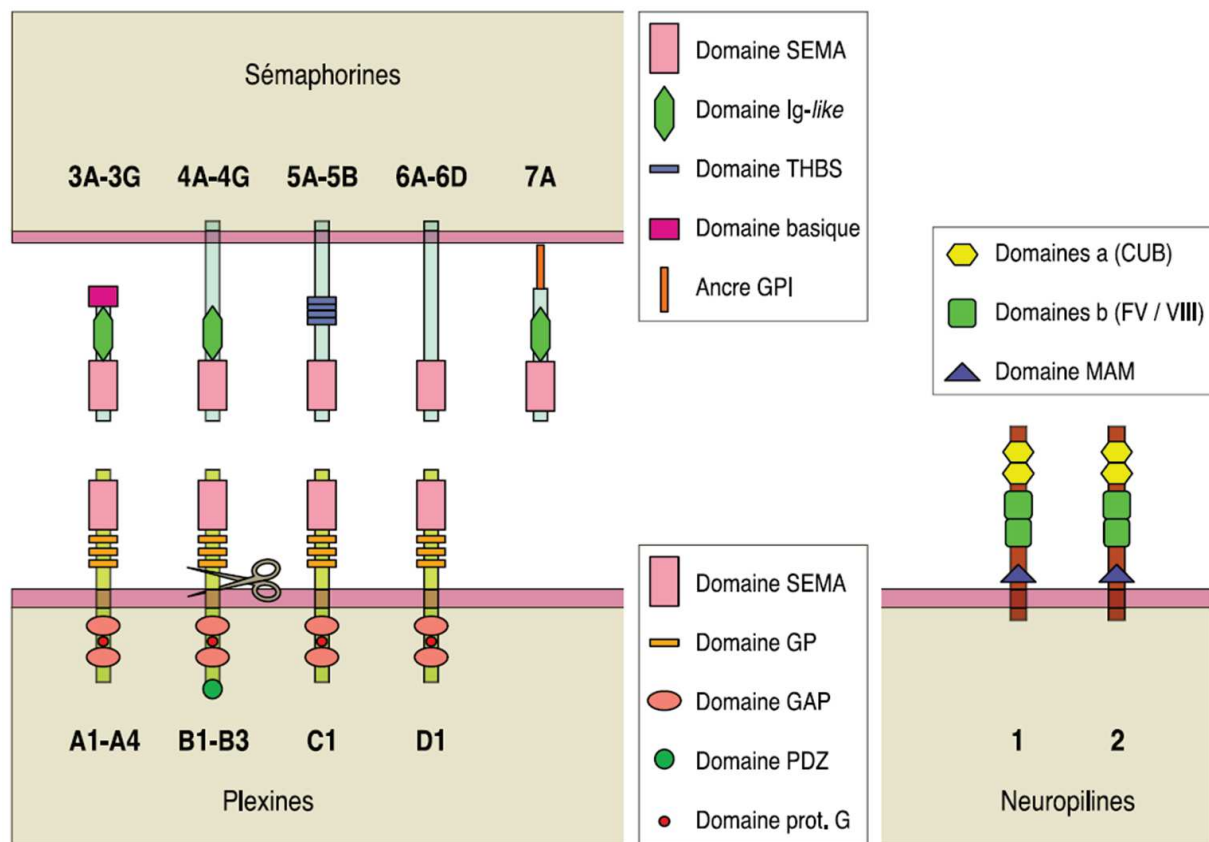


Figure 11 : Structure générale des sémaphorines, des plexines et des neuropilines. Les sémaphorines sont constituées de vingt protéines réparties en cinq classes (SEMA 3 à SEMA7). Elles sont soit sécrétées (SEMA3) soit liées à la membrane par un domaine transmembranaire (SEMA4 à SEMA6) ou par ancrage à l'aide d'un glycosylphosphatidylinositol (GPI) (SEMA7). Les sémaphorines contiennent toutes un domaine SEMA permettant l'interaction avec leur récepteur. Selon la classe, elles possèdent un domaine immunoglobulin-like (IgG), un domaine thrombospondin-like (THBS) et un domaine basique. Les plexines forment un groupe de neuf protéines réparties en quatre classes (Plexine A à D). Ce sont des protéines transmembranaires, composées d'un domaine SEMA et de domaines riches en glycine et en proline (GP) du côté extracellulaire. En intracellulaire, elles possèdent un domaine GAP, un domaine de liaison aux GTPase Rho ainsi qu'exclusivement pour les plexines B, un domaine PDZ de liaison aux GEFs. Il existe deux neuropilines : NRP1 et NRP2. Ce sont des protéines transmembranaires avec un domaine intracellulaire court. En extracellulaire, elles possèdent deux domaines de liaison a au complément, CUB, deux domaines homologues b au facteur de coagulation V/VIII et d'un domaine MAM important pour leur dimérisation et leur interaction avec d'autres récepteurs (Robert, 2010).

Interaction RND1-plexine A1 (Figure 12)

La liaison du ligand sémaphorine 3A (Sema3A) avec le complexe neuropiline 1 (NRP1) - plexine A1 induit le collapsus des cônes de croissance. Les fibroblastes Cos-7 sont utilisés comme modèle pour mimer le collapsus des cônes de croissances de neurones. Dans ces cellules, l'interaction de RND1 avec la plexine A1 induit le collapsus des cônes de croissance. Cet effet se produit même en absence de la Sema3A ou du co-récepteur NRP1 (Zanata et al., 2002). L'effet de RND1 est lié à de l'activité GAP de la plexine A1 qui est responsable d'une diminution de l'activité de R-Ras. Dans des neurones d'hippocampe du rat exprimant une forme constitutivement active de R-Ras, l'induction du collapsus des cônes de croissance par Sema3A est inhibé (Oinuma et al., 2004a). Par ailleurs, l'interaction de RND1 avec la plexine A1 peut être inhibée par RhoD, qui se fixe sur le même site de liaison que RND1 (Zanata et al., 2002).

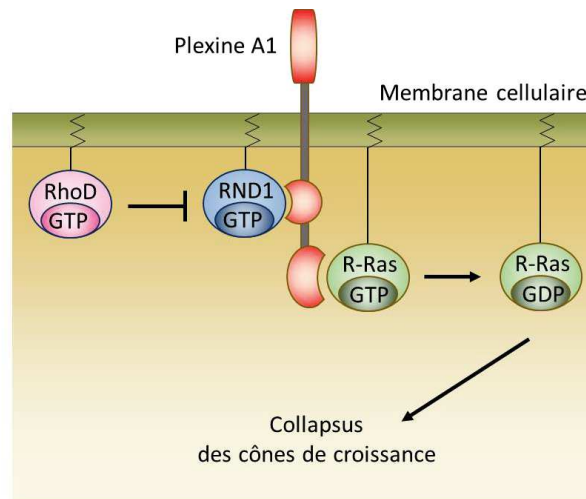


Figure 12 : Schéma récapitulatif des effets de RND1 sur la formation des connexions nerveuses dépendant de la plexine A1 (Adapté de Chardin, 2006).

Interaction RND1 – Plexine B1 (Figure 13)

Dans les cellules Cos-7, la co-expression de RND1 et de la plexine B1 entraîne la contraction des cellules après stimulation par son ligand, la sémaphorine 4D (Sema4D). Cet effet dépend de deux mécanismes indépendants. Le premier est lié à l'augmentation de l'activité de la GTPase RhoA. En effet, RND1 induit l'interaction entre la plexine B1 et PDZ-RhoGEF et par conséquent augmente l'activation de RhoA et de son effecteur ROCK. Les changements morphologiques résultants vont mener au collapsus des cônes de croissance (Oinuma et al., 2003). Le deuxième mécanisme dépend de l'inhibition de l'activité de R-Ras. RND1 induit la liaison de la plexine B1 avec R-Ras sous sa forme active lié au GTP. Après stimulation par Sema4D, le domaine GAP de la plexine B1 stimule l'activité GTPasique de R-Ras et par

conséquent inhibe l'activation de R-Ras. Dans les cellules PC-12, l'inhibition de R-Ras GTP entraîne la rétraction des neurites (Oinuma et al., 2004a; Oinuma et al., 2004b).

Interaction RND1 – Plexine B2 ou B3 (Figure 13)

Dans les cellules Cos-7, la co-expression de RND1 et de ces plexines entraîne également la contraction des cellules après stimulation par Sema4D (Yukawa et al., 2010).

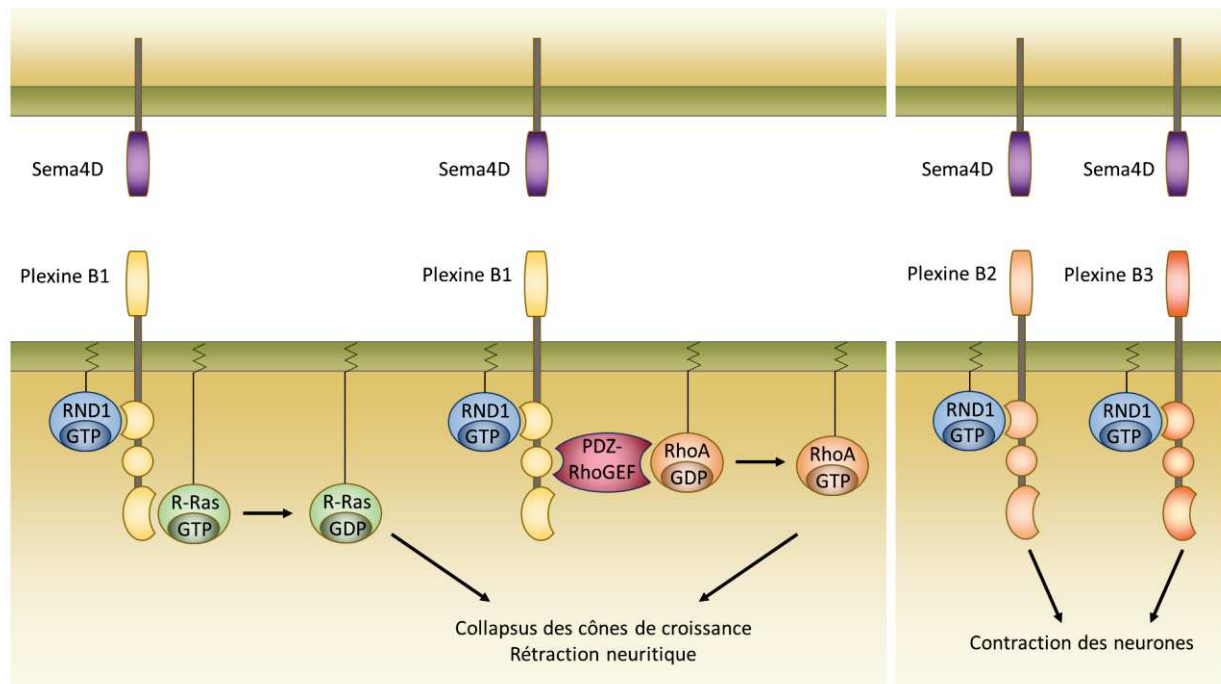


Figure 13 : Schéma récapitulatif des effets de RND1 sur la formation des connexions nerveuses dépendant des plexines B1, B2 et B3 (Adapté de Chardin, 2006).

RND1 régule également la polarité neuronale par des mécanismes indépendants des plexines (Figure 14). Dans les cellules PC-12, l'inhibition de RND1 par siRNA supprime l'extension neuritique induite par le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) (Harada et al., 2005). L'effet de RND1 sur l'extension neuritique est lié à la fois à sa liaison à la protéine FRS2 β (FGFR substrate 2 β) ainsi qu'à sa fonction inhibitrice sur RhoA. FRS2 β est une protéine adaptatrice qui peut interagir avec le récepteur aux facteurs de croissance des fibroblastes 1 (FGFR1). La stimulation des cellules par les FGF induit la phosphorylation de FRS2 β par FGFR1 activé. Si la voie du FGFR est inactive, RND1 interagit directement avec FRS2 β *in vitro*. Cette interaction supprime l'inhibition de RND1 sur l'activité de RhoA. La phosphorylation de FRS2 β dissocie RND1 de FRS2 β et ainsi rétablit l'inhibition de RhoA (Harada et al., 2005).

RND1 peut interagir avec STI1 (Stress-Inducible Protein), protéine co-chaperone qui s'associe avec HSP70/HSP90 (de Souza et al., 2014). STI1, après avoir été sécrétée, interagit avec la protéine prion afin de favoriser la formation de cellules souches neuronales, l'extension neuritique et la neuroprotection (Lackie et al., 2017). L'interaction entre RND1 et STI1 entraîne l'inhibition du collapsus des cônes induit par l'interaction RND1 - Plexine A1 dans les cellules Cos-7 et augmente l'extension neuritique dans les cellules PC-12 (Figure 14) (de Souza et al., 2014).

2. Régulation du réseau microtubulaire

SCG10 (Superior Cervical Ganglion 10) est une protéine qui déstabilise les microtubules neuronaux dans le cône de croissance et qui est essentielle pour la croissance des axones (Grenningloh et al., 2004). L'interaction de RND1 avec SCG10 augmente les effets de SCG10 sur la dépolymérisation des microtubules et induit la croissance des axones dans des neurones d'hippocampes de rat (Figure 14) (Li et al., 2009).

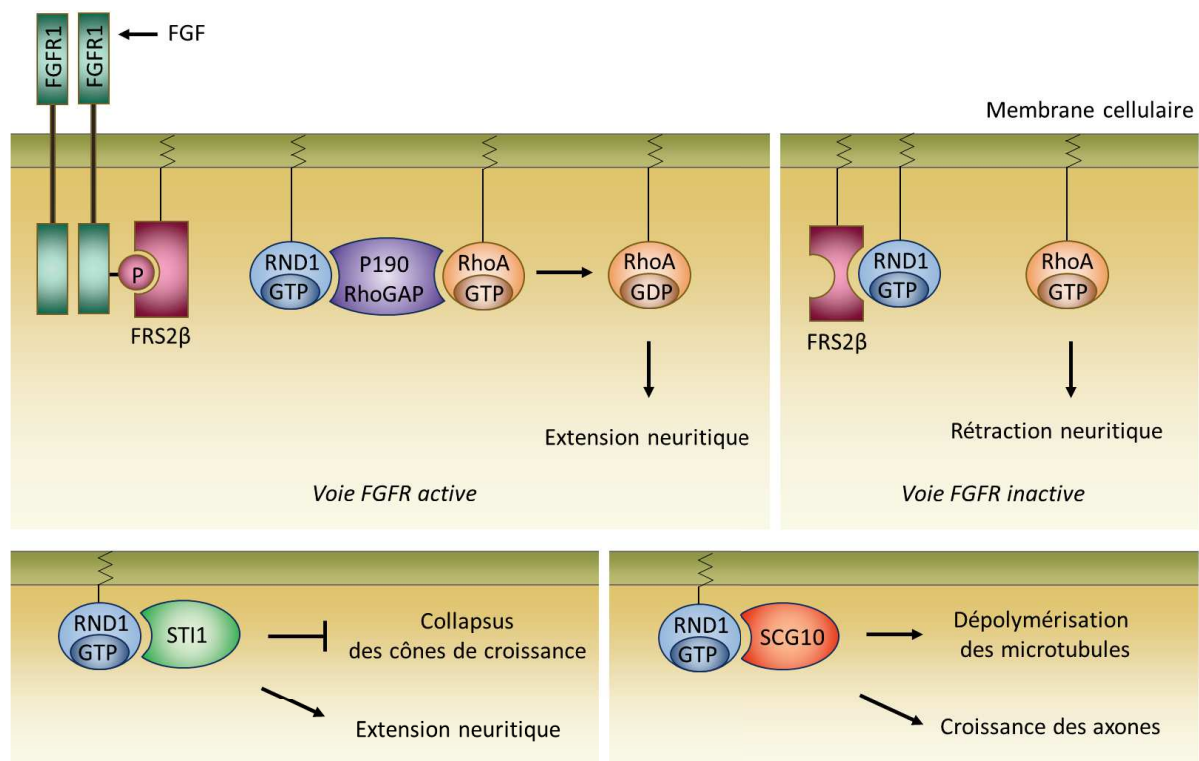


Figure 14 : Schéma récapitulatif des effets de RND1 sur la formation des connexions nerveuses indépendamment des plexines (Adapté de Chardin, 2006).

I.2.4.3 Rôle dans le développement embryonnaire.

L'expression ectopique de RND1, par injection de l'ARN de RND1 dans des embryons de Xénope au stade 4 cellules, entraîne une perte de l'adhésion cellulaire au stade blastula. La surexpression de RhoA, par co-injection au stade 4 cellules, reverse cet effet (Wunnenberg-Stapleton et al., 1999). L'inhibition de RND1, par un antisens injecté à l'embryon de Xénope, induit une perte d'élongation de la notochorde pendant la gastrulation (Figure 15A), une perte d'élongation de la coiffe animale (Figure 15B) et une augmentation de l'adhésion cellulaire dépendante de la cadhérine (Figure 15C). Tous ces effets sont rétablis par injection de l'ARNm de RND1 (Figure 15 A, B et C) (Ogata et al., 2007). L'inhibition de l'adhésion cellulaire par RND1 est réalisée via la liaison avec la protéine transmembranaire FLRT3 (Fibronectin Leucine Rich Transmembrane 3), mais également avec le récepteur à la nétrine : Unc5B (Karaulanov et al., 2009; Ogata et al., 2007). L'interaction entre RND1 et FLRT3 inhibe l'adhésion cellulaire en diminuant le niveau de C-cadhérine présent à la surface de la cellule via l'internalisation de la C-cadhérine dans le cytosol. En revanche, l'effet de l'interaction avec Unc5B sur l'internalisation de C-cadhérine n'a pas été exploré.

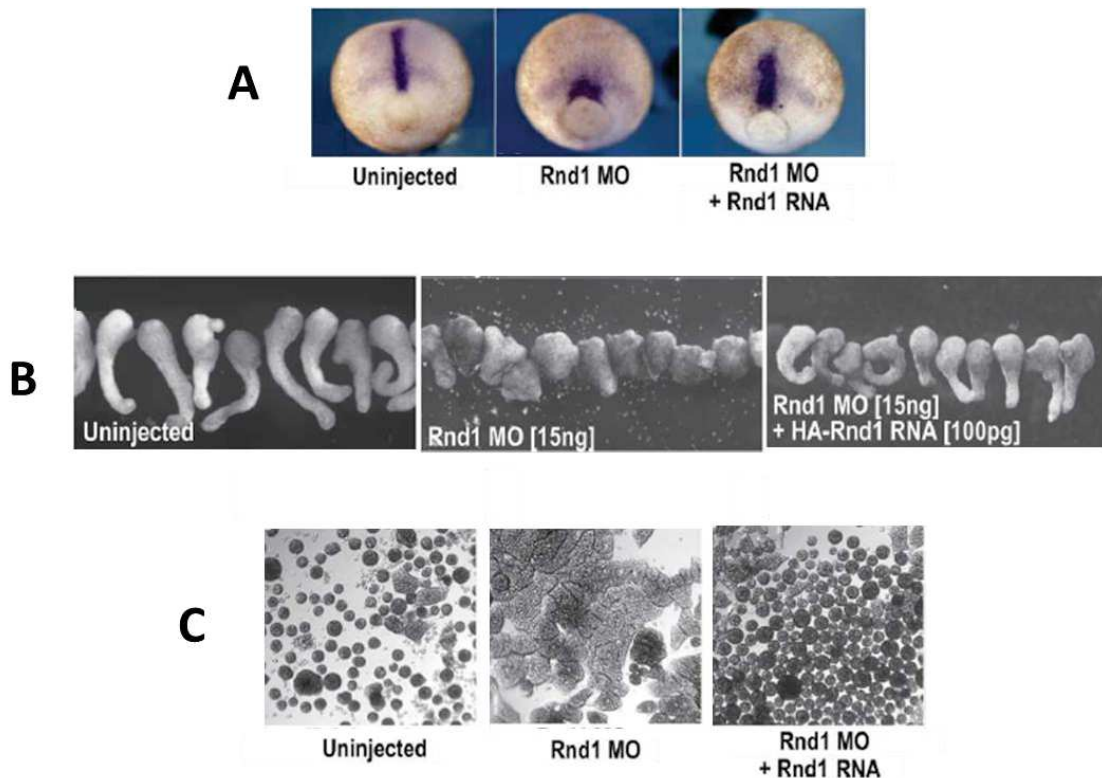


Figure 15 : Effets de RND1 sur le développement embryonnaire du Xénope. (A) Les cellules de la notochorde d'embryons de Xénope sont localisées par la technique d'hybridation in situ. L'inhibition de RND1 par injection d'un antisens (RND1 MO) entraîne la perte d'élongation de la notochorde. L'effet est rétabli par l'injection de l'ARNm de RND1. (B) Explants de coiffes animales d'embryons de Xénope. L'injection RND1 MO bloque l'élongation des coiffes. L'effet est rétabli par l'injection de l'ARNm de RND1 (HA-RND1). (C) RND1 MO augmente l'adhésion des cellules du mésoderme dorsal de façon dépendante à la cadhérine. L'effet est inhibé par ajout de l'ARNm de RND1 (D'après Ogata et al., 2007).

Il a également été montré que RND1 joue un rôle dans la somitogenèse, processus permettant la différenciation et la segmentation des somites à partir du mésoderme. Dans ce mécanisme, RND1 est sous le contrôle de la voie Notch (Goda et al., 2009).

I.2.4.4 Rôle dans l'angiogenèse

L'expression de RND1 est induite par le facteur de croissance VEGF via l'interaction transitoire de NFATc1 avec le promoteur de RND1 dans les cellules endothéliales du cordon ombilical HUVEC. Cette induction permet de moduler l'activité de RhoA et ainsi de limiter l'angiogenèse (Figure 16). En effet dans les cellules HUVEC, l'inhibition de RND1 augmente l'activation de RhoA médié par VEGF. Cette hyperactivation entraîne une augmentation de la perméabilité de l'endothélium, de la migration et de la formation de néo-vaisseaux (Suehiro et al., 2014).

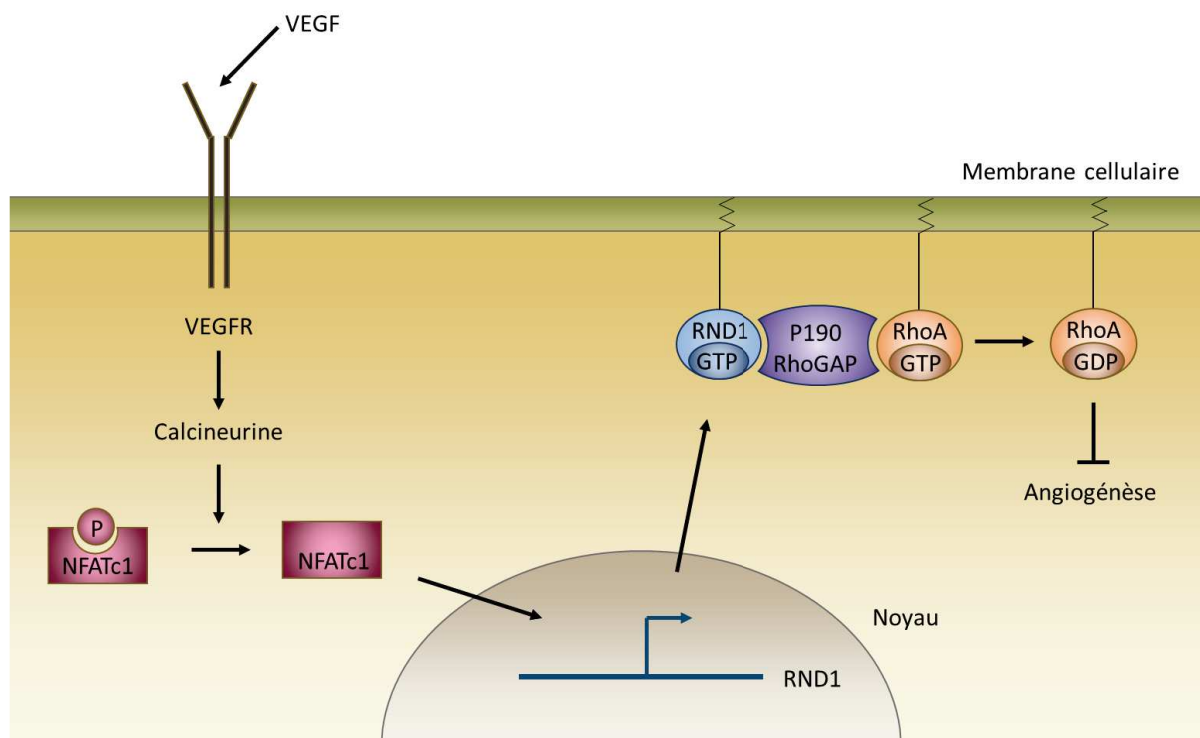


Figure 16 : Schéma récapitulatif des effets de RND1 sur l'angiogenèse dans un mécanisme dépendant de la voie VEGFR/Calcineurine/NFATc1 (Adapté de Suehiro et al., 2014).

Tableau 3 : Principaux effecteurs interagissant avec RND1 et leurs fonctions.

Effecteurs	Mécanismes	Fonctions	Références
p190RhoGAP	Inhibition RhoA	Inhibition fibres de stress Contraction cellulaire ("round")	Wennerberg et al., 2003
Syx	<i>Inhibition RhoA ?</i> Stabilisation protéine RND1		Goh and Manser, 2010
Socius		Inhibition fibres de stress	Katoh et al., 2002
Grb7			Vayssiere et al., 2000
Plexine A1	Inhibition R-Ras	Rétraction neuritique Collapsus cône de croissance	Rohm et al., 2000 Zanata et al., 2002 Oinuma et al., 2004a
Plexine B1	Activation RhoA Inhibition R-Ras Inhibition Ras	Rétraction neuritique Rétraction neuritique Initiation tumorigénèse et invasion dans le cancer du sein	Oinuma et al., 2003 Oinuma et al., 2004a Oinuma et al., 2004b Okada et al., 2015
Plexines B2 et B3		Rétraction neuritique	McColl et al., 2016 Yukawa et al., 2010
FRS2β	Inhibition RhoA	Croissance neuritique	Harada et al., 2005
SCG10	Réseau microtubulaire	Croissance axonale	Li et al., 2009
STI1		Croissance neuritique	de Souza et al., 2014
FLRT3	Internalisation c-cad	Inhibition adhésion cellulaire	Ogata et al., 2007
Unc5B			Karaulanov et al., 2009

I.2.4.5 RND1 et cancer

Comme décrit auparavant, RND1 est impliqué dans la régulation de la morphologie, de l'adhésion et la migration cellulaire ainsi que de l'angiogenèse. Ces différents processus sont impliqués dans la carcinogénèse. Récemment, plusieurs études ont montré l'implication de RND1 dans les cancers. Cependant, selon le contexte tumoral, RND1 semble exercer un rôle pro ou anti-cancéreux.

1. Expression de RND1 dans les tumeurs

L'expression de RND1 dans les cancers varie en fonction de l'origine de la tumeur, de son agressivité ou encore du stade de la maladie.

Deux premières études ont permis d'identifier RND1 comme potentiel gène suppresseur de tumeurs dans l'adénocarcinome du pancréas et le carcinome adénoïde kystique. En effet la région 12q12-q13 du chromosome 12 comprenant RND1 est fréquemment délétée dans ces cancers (Aguirre et al., 2004; Rutherford et al., 2005). Différentes analyses bioinformatiques menées par Okada et al. montrent qu'une plus faible expression de RND1 est retrouvée dans les cancers du sein les plus agressifs par rapport aux moins agressifs. De plus, cette baisse est associée à la formation de métastases (Okada et al., 2015). Dans 17% des carcinomes primaires du sein, la perte d'un allèle de RND1 a été observée. Cependant aucune délétion homozygote n'a été rapportée. Ainsi, l'inhibition de l'expression de RND1 ne dépend pas uniquement de mécanismes génétiques mais également épigénétiques. En effet, l'expression de RND1 dans les cancers du sein est réprimée par la méthylation de son promoteur (Okada et al., 2015). Néanmoins, les résultats sur l'expression de RND1 dans les cancers du sein divergent. En effet, Shen et al. ont montré que l'expression de RND1 est augmentée dans les lignées MDA-MB-231 et SK-BR-3 par rapport aux lignées MCF-10A et MCF-7 possédant un plus faible pouvoir métastatique (Shen et al., 2014). De plus, une ancienne étude avait rapporté une augmentation de l'ARNm de RND1 dans les tumeurs mammaires par rapport aux tissus sains (Jiang et al., 2003).

L'expression de RND1 est diminuée dans les carcinomes hépato-cellulaires (CHC) et cette baisse progresse avec le stade avancé de la maladie (Komatsu et al., 2017). De même que dans l'étude d'Okada et al., l'expression de RND1 est réprimée par la méthylation de son promoteur.

Contrairement aux cancers du sein et aux CHC où le promoteur de RND1 est hyperméthylé, celui-ci est hypométhylé dans les cancers gastriques. Par conséquent, l'ARNm de RND1 est augmenté dans les tissus de cancer gastrique par rapport aux tissus sains (Nishigaki et al., 2005a).

RND1 est également surexprimée dans le carcinome épidermoïde de l'œsophage (CEO) (Xiang et al., 2016).

Par ailleurs, des analyses transcriptomiques montrent une inhibition de RND1 dans le glioblastome (Cf article 2).

Certaines mutations de RND1 ont été identifiées dans les cancers. Parmi 96 échantillons de cancers du sein, 4 mutations faux-sens dans la séquence de RND1 ont été rapportées (G70R, F180C, E98D, M185V). Ces mutations concernent des acides aminés hautement conservés au cours de l'évolution. Il a notamment été observé que les mutations G70R, F180C et E98D

entraînent la perte de l'interaction entre RND1 et la plexine B1 (Okada et al., 2015). De plus, des analyses TCGA (The Cancer Genome Atlas) indiquent que RND1 est inhibée par mutation inactivatrice dans 3,9% des mélanomes (Okada et al., 2015).

2. Fonctions de RND1 dans les cancers

Dans la lignée MCF-10A de cellules épithéliales mammaires, l'inhibition de RND1 par shRNA (short hairpin RNA) entraîne le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) via l'internalisation et l'inhibition de la E-cadhérine (E-cad) ainsi que la surexpression de la N-cadhérine (N-Cad). L'effet de RND1 sur l'EMT dépend de sa liaison avec la plexine B1. Cette liaison entraîne l'activation du domaine GAP de la plexine et l'inhibition de la signalisation de Ras via l'inhibition de l'activation de la protéine Rap1 (Figure 17). De plus, l'inhibition de RND1 permet l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN observée par l'augmentation de Chk2 et de la forme phosphorylée de H2AX (γ H2AX). Par ailleurs, l'inhibition de RND1 entraîne une hyperprolifération transitoire des cellules puis l'arrêt précoce du cycle cellulaire et la sénescence des cellules via l'induction de p27. Cependant, certaines cellules déplétées pour RND1 résistent à la sénescence en surexprimant c-Myc ce qui permet d'inhiber p27. L'expression de Myc confère alors à ces cellules des propriétés hyperprolifératives et invasives.

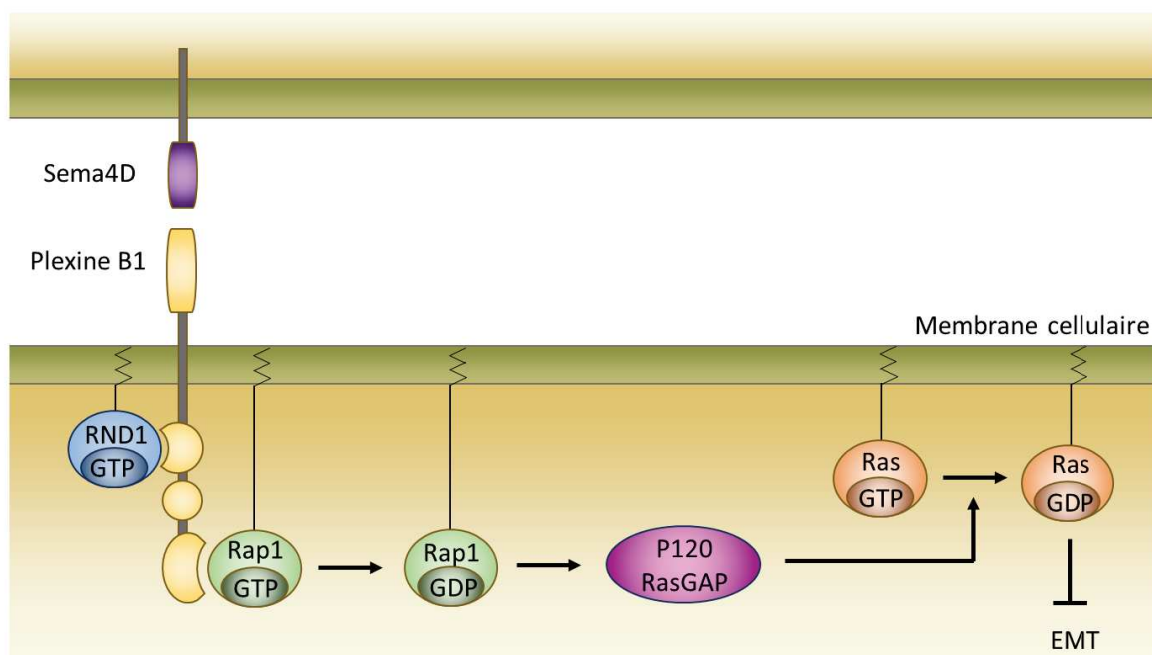


Figure 17 : Schéma récapitulatif de l'effet de RND1 sur l'inhibition de l'EMT par inactivation de Ras (Adapté de Okada et al., 2015).

In vivo, RND1 inhibe l'initiation mais également la progression tumorale. Des cellules épithéliales mammaires, Comma-D, non tumorigènes déficientes en RND1 par shRNA ont été injectées à des souris. L'inhibition de RND1 dans ces cellules leur a permis d'acquérir des propriétés liées à l'EMT et a entraîné la formation de tumeurs chez la souris (Figure 18A). De plus, l'injection à des souris de cellules tumorales mammaires 4T1 surexprimant RND1 mène à un retard de croissance de la tumeur primaire (Figure 18B) ainsi que diminue la formation de métastases dans les poumons (Figure 18C) (Okada et al., 2015).

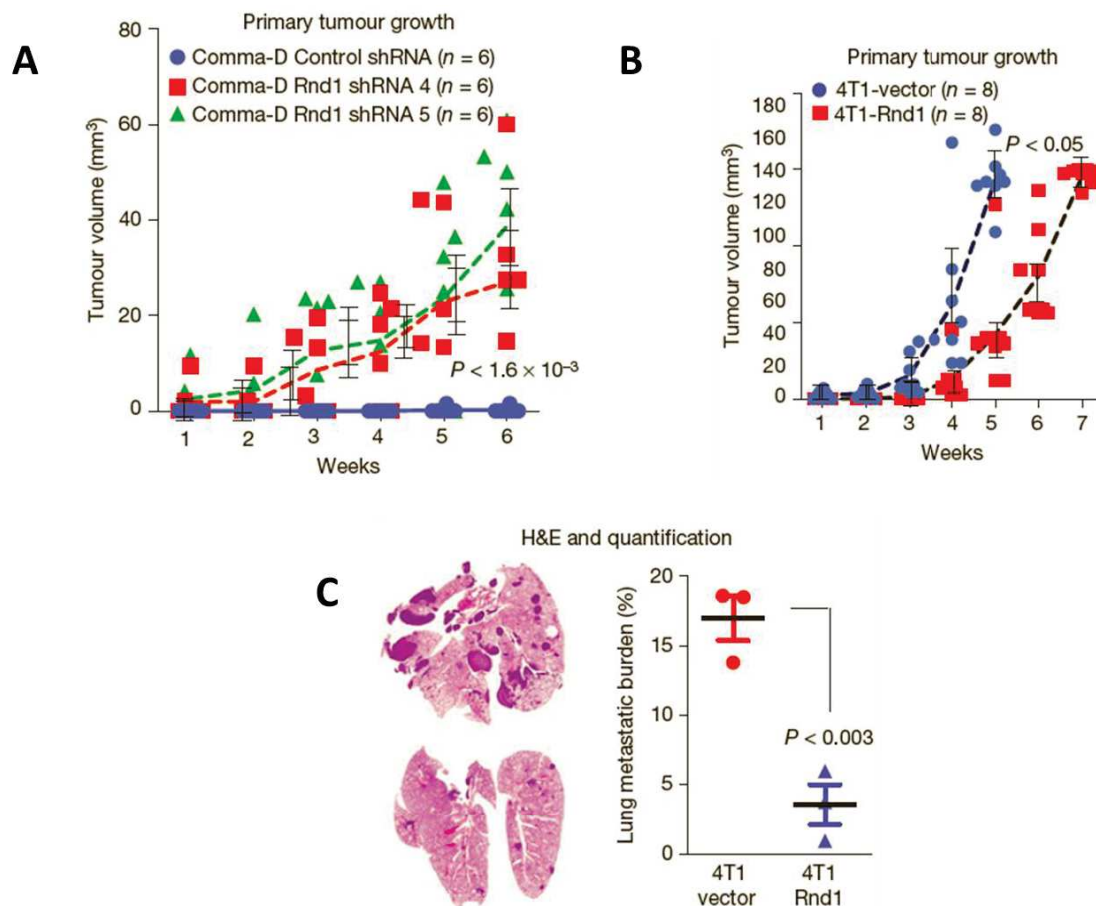


Figure 18 : Effets de RND1 l'inhibition de la tumorigenèse mammaire et la formation de métastases. (A) Les cellules épithéliales mammaires Comma-D transduites avec un lentivirus Shtrl ou deux ShRND1 ont été injectées à des souris. Le volume de la tumeur a été mesuré aux temps indiqués. (B et C) Les cellules tumorales mammaires 4T1 transfectées avec un plasmide contrôle ou un plasmide HA-RND1 ont été injectées à des souris. Le volume de la tumeur a été mesuré aux temps indiqués (B). Image représentative d'une coupe histologique de poumons et quantification de la présence de métastases pulmonaires dans les souris injectées avec le plasmide contrôle vs. RND1 (C) (D'après Okada et al., 2015).

A l'inverse, dans la lignée du cancer du sein MDA-MB-231, l'expression ectopique de RND1 entraîne l'augmentation de la migration et l'invasion des cellules. Dans cette même lignée, l'inhibition de RND1 par shRNA induit l'expression de la E-cad. Dans ce modèle,

l'expression de RND1 permet de réverser les effets inhibiteurs du facteur de transcription Oct4 sur le processus métastatique (Shen et al., 2014). Ainsi, le rôle de RND1 dans le cancer du sein est controversé.

L'inhibition de RND1 par siRNA dans des lignées d'HCC augmente la prolifération et l'invasion des cellules (Komatsu et al., 2017). De même que dans l'étude d'Okada et al., l'expression de RND1 est inversement corrélée aux taux des protéines Ras et c-Myc.

La surexpression de RND1 dans deux lignées de CEO : KYSE150 et KYSE180 entraîne une augmentation de la croissance cellulaire et de la migration via notamment l'activation de la voie ERK. *In vivo*, l'inhibition de RND1 dans des cellules KYSE180 injectées à des souris diminue la formation de métastases (Xiang et al., 2016).

Ces données rapportent un rôle pro-tumoral ou anti-tumoral de RND1 en fonction du contexte cellulaire.

Récemment, une étude effectuée en collaboration avec l'équipe du Pr E. Cohen-Jonathan Moyal et du Dr C. Toulas du CRCT s'est intéressée au rôle de RND1 dans le glioblastome (Cf article 2). La récurrence dans le traitement du glioblastome pourrait s'expliquer par la présence de cellules souches tumorales de glioblastome (CSG) dans la zone périventriculaire du cerveau (ZPV). Ces cellules sont dotées d'une capacité migratoire supérieure à celles situées dans la zone corticale (ZC). Une expression plus faible de RND1 est retrouvée dans les CSG ZPV en comparaison aux CSG ZC. La surexpression de RND1 dans les CSG ZPV inhibe leur migration. Ce travail permet de souligner le rôle anti-tumoral de RND1 dans le glioblastome.

3. Facteur pronostique

RND1 a été nouvellement identifié comme biomarqueur prédictif de la maladie dans les CHC (Komatsu et al., 2017), les glioblastomes (Cf article 2) et les cancers du sein ER-, c'est-à-dire n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes (Okada et al., 2015). Dans ces tumeurs, une faible expression de RND1 est associée à un mauvais pronostic.

Cependant, une ancienne étude avait rapporté qu'une augmentation de l'expression de RND1 dans les cancers du sein était associée à l'avancement du stade de la maladie et également à une rechute des patients (Jiang et al., 2003). Ces données confirment le double rôle de RND1 dans le cancer du sein.

cse

4. Effet de RND1 sur la sensibilité des cellules aux anticancéreux

Il existe actuellement peu de données relatant l'effet de l'expression de RND1 sur la sensibilité des cellules aux cytotoxiques. Il a uniquement été rapporté que l'inhibition de RND1 par siRNA induit la résistance des cellules d'HCC au traitement par le cisplatine (Komatsu et al., 2017).

II. Les inhibiteurs de la topoisomérase I

II.1. Les ADN topoisomérases

Les ADN topoisomérases sont des enzymes ubiquitaires hautement conservées à travers l'évolution. La famille des topoisomérases intervient dans la régulation de la topologie de l'ADN en supprimant les surenroulements de l'ADN associés aux processus de réplication et de transcription (Pommier et al., 2016b; Schoeffler and Berger, 2008; Wang, 2002). Les cellules somatiques humaines expriment six topoisomérases (Tableau 4). Une septième enzyme, *spo11*, est uniquement exprimée dans les cellules germinales humaines (Bergerat et al., 1997). Les topoisomérases sont également présentes chez les bactéries où quatre enzymes sont exprimées (Pommier et al., 2010). Les topoisomérases induisent des cassures de l'ADN par réaction de transestérification permettant la liaison d'un résidu tyrosine catalytique de l'enzyme à l'extrémité phosphate (p-Y) du brin d'ADN coupé. Pour modifier la topologie de l'ADN, les topoisomérases sont divisées en différentes classes selon le nombre de clivage de brin d'ADN (un ou deux) et selon la polarité de cette coupure (5' ou 3') (Tableau 4).

Tableau 4 : Classification des topoisomérases humaines

	TYPE IA	TYPE IB	TYPE IIA
GENES	TOP3A ET TOP3B	TOP1 ET TOP1MT	TOP2A ET TOP2B
POLARITÉ	5'-p-Y	3'-p-Y	5'-p-Y
MÉCANISME	Passage du brin	Rotation du brin	Passage des brins ATP dépendent
FONCTIONS	- Relaxation des Sc- - Décaténation de l'ADN - Dissolution des jonctions de Holliday	- Relaxation des Sc- et +	- Relaxation des Sc- et + - Décaténation de l'ADN
INHIBITEURS	Non	Oui (Anticancéreux)	Oui (Anticancéreux)

Sc- : Surenroulements négatifs, Sc+ : Surenroulements positifs. (D'après Pommier et al., 2016b)

Les topoisomérases clivant un seul brin d'ADN sont de type I. Au sein de cette famille, les topoisomérases sont subdivisées en deux-sous types selon l'orientation de la coupure (IA et IB). Les topoisomérases IA se fixent sur l'extrémité 5' du brin coupé, alors que les topoisomérases IB se lient à l'extrémité 3'. Après le clivage de l'ADN, les enzymes modifient la topologie de l'ADN par deux mécanismes différents (Figure 19). Les topoisomérases IA suppriment uniquement les surenroulements négatifs en passant le brin intact à travers le brin

cassé (Viard and de la Tour, 2007). Les topoisomérases IB suppriment aussi bien les surenroulements positifs que négatifs en permettant au brin clivé d'effectuer une rotation autour du brin non coupé (Cf. partie II.2.1.) (Koster et al., 2005). Les topoisomérases IA et IB n'ont pas besoin d'énergie pour leur activité mais les topoisomérases IA nécessitent la présence du cofacteur Mg^{2+} . Chez l'homme, il existe deux isoformes de topoisomérases IA : les topoisomérases 3α et 3β (Top3 α , Top3 β) et deux isoformes de topoisomérases IB : la topoisomérase 1 nucléaire (Top1) et la topoisomérase 1 mitochondriale (Top1mt) que l'on retrouve uniquement chez les vertébrés.

Les topoisomérases clivant les deux brins de l'ADN sont les topoisomérases IIA. Les topoisomérases IIA fonctionnent en tant qu'homodimères et induisent une cassure double-brin (DSB) en se liant à l'extrémité 5' de l'ADN clivé. Ces enzymes suppriment les surenroulements négatifs et positifs de l'ADN en permettant le passage d'un second segment d'ADN à travers le premier segment d'ADN clivé par un mécanisme dépendant de l'ATP et de Mg^{2+} (Figure 19) (Schmidt et al., 2012; Schoeffler and Berger, 2005). Chez l'homme, deux isoformes de topoisomérases IIA sont exprimés: les topoisomérases 2α et 2β (Top2 α , Top2 β).

L'étude des topoisomérases a permis le développement de molécules anti-bactériennes et anti-cancéreuses ciblant les topoisomérases bactériennes et humaines respectivement (Pommier et al., 2010). Parmi les agents anticancéreux, deux analogues de la camptothécine, un inhibiteur de la Top1 très sélectif, possèdent une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) en France (Cf. partie II.3.1.1.). De même, des inhibiteurs de la Top2 tels que l'étoposide ou la doxorubicine sont utilisés dans les chimiothérapies anti-cancéreuses.

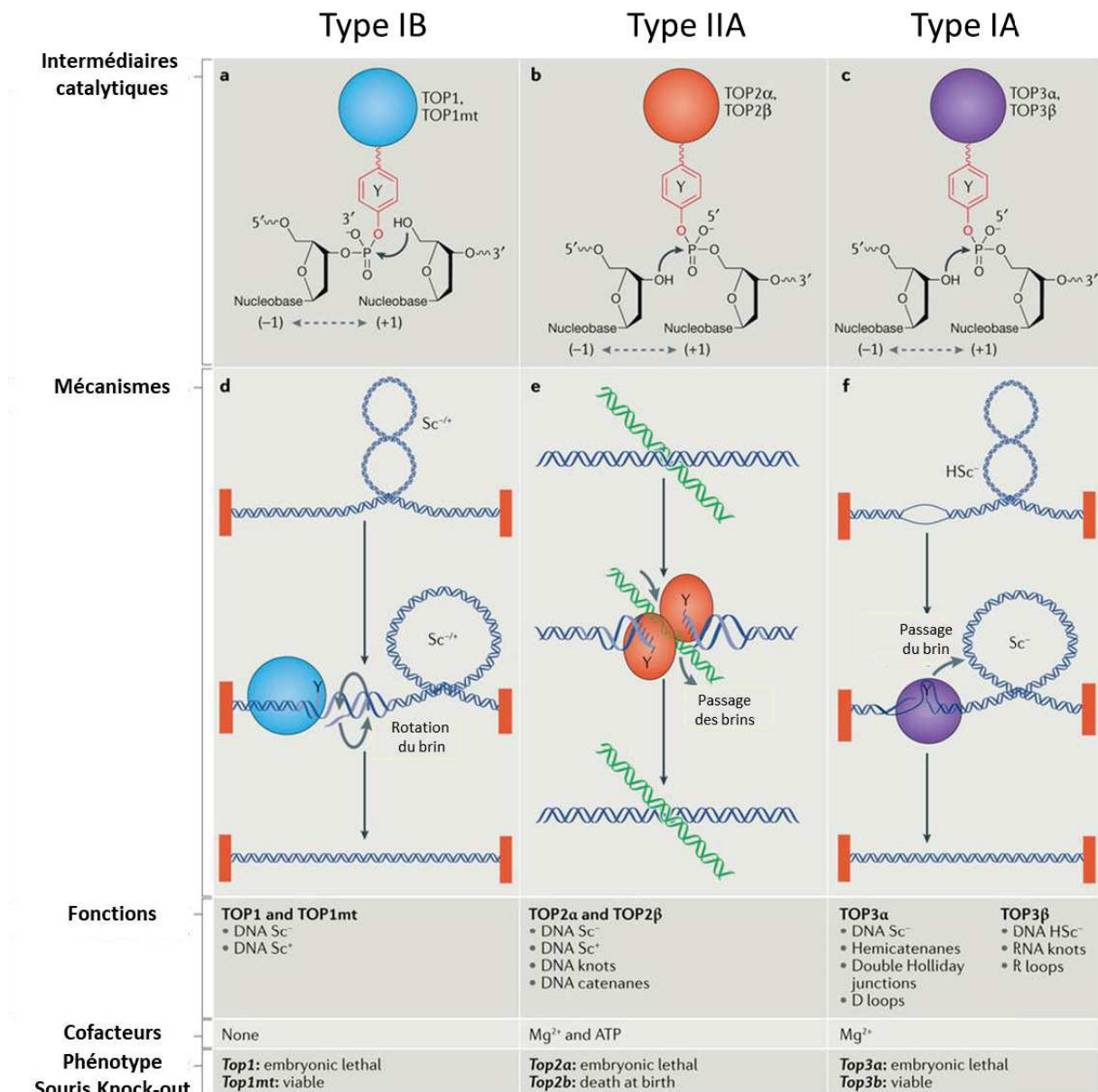


Figure 19 : Schéma des différents mécanismes catalytiques des topoisomérases. Les topoisomérases IB se lient à l'extrémité 3' de l'ADN (a) alors que les topoisomérases IIA et IA se lient à l'extrémité 5' (b et c). Les topoisomérases IB agissent en permettant la rotation du brin clivé (d). Les topoisomérases IIA et IA permettent le passage d'un deuxième brin à travers les cassures double-brin et simple-brin respectivement (e et f) (D'après Pommier et al., 2016b).

II.2. La topoisomérase I nucléaire (Top1)

II.2.1. Organisation structurale de Top1

Le gène TOP1 humain, localisé au niveau du chromosome 20q11.2-13.11, code pour une protéine de 91 kDa subdivisée en 4 domaines distincts (Figure 20) (Champoux, 2001; Redinbo et al., 1998; Stewart et al., 1996) :

- le domaine N-terminal : Ce domaine est le plus variable et n'est pas essentiel pour l'activité de relaxation *in vitro* (Stewart et al., 1997). Il contient plusieurs signaux de localisation

nucléaire et des sites de liaison à différentes protéines comme certains facteurs de transcription (TBP : TATA-binding protein, p53...) et WRN (Werner Syndrome RecQ Like Helicase).

- le domaine central (Core) : Ce domaine, hautement conservé, est nécessaire à l'activité enzymatique de la Top1. Il est formé de trois sous-domaines qui encerclent la molécule d'ADN comme une pince. La première moitié de la pince comprend les sous-domaines I et II. L'autre moitié est composée du sous-domaine III contenant la totalité des résidus requis pour l'activité catalytique de la Top1, à l'exception de la tyrosine catalytique.

- le domaine Linker : Comme pour le domaine N-ter, il n'est pas requis pour l'activité de la Top1 *in vitro*. Il permet de relier le sous-domaine III au domaine C-ter. Sa localisation parallèle à la molécule d'ADN lui permet de contrôler la rotation du brin clivé pendant l'étape de relaxation.

- le domaine C-terminal : Ce domaine est le plus conservé. Il contient la tyrosine kinase catalytique T723 permettant la liaison covalente avec l'extrémité 3' du brin coupé, étape nécessaire à la relaxation des surenroulements de l'ADN.

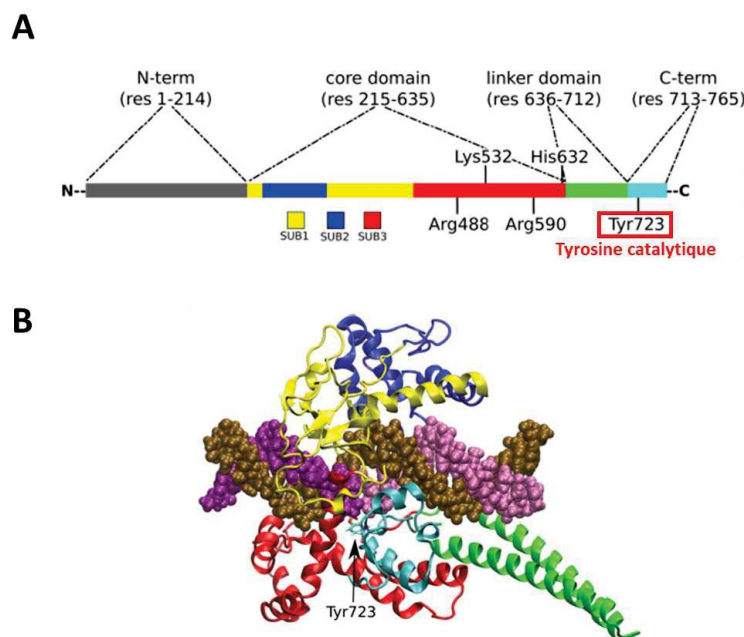


Figure 20 : Schéma des domaines et structure 3D de la Top1 nucléaire humaine. (A) Organisation des 4 domaines de la protéine Top1 constituée de 765 acides aminés. Le domaine core est divisé en 3 sous-domaines. Les 5 acides aminés nécessaires à l'activité catalytique de la Top1 sont indiqués. Quatre sont situés au niveau du sous-domaine III (Arg488, Lys532, Arg590 et His632) et la tyrosine catalytique (Tyr723) se trouve en C-ter. (B) Structure cristallographique du complexe Top1-ADN. Le brin d'ADN clivé est représenté en violet, celui qui est intact est en marron. Les domaines core et C-ter forment une pince autour de la molécule d'ADN. Ces deux domaines sont reliés par le domaine linker, situé parallèlement à l'ADN. Le résidu tyrosine catalytique 723 forme la liaison covalente au brin d'ADN clivé. Le brin coupé peut alors effectuer une rotation autour du brin intact (D'après Capranico et al., 2017).

II.2.2. Cycle catalytique

Le cycle catalytique de la Top1 est divisé en quatre étapes (Figure 21) :

1) Liaison non covalente de la Top1 à l'ADN : La Top1 se lie préférentiellement sur l'ADN surenroulé (Camilloni et al., 1988; Krogh et al., 1991). Même si la Top1 ne reconnaît pas de séquences spécifiques sur l'ADN, elle lie l'ADN au niveau de sites « privilégiés » contenant le motif : 5' - (A/T) (G/C) (A/T) T -3'. Le dernier résidu thymine correspond au site de clivage de la Top1 (Jaxel et al., 1991). Au moment de la liaison, la Top1 s'enveloppe autour de l'ADN en formant une pince (Redinbo et al., 1998).

2) Clivage d'un brin d'ADN : la Top1 coupe un brin de la double hélice par réaction de transestérification qui permet la formation d'un lien covalent entre la tyrosine catalytique (Tyr723) et l'extrémité 3' du brin clivé (Champoux, 1981). Le complexe covalent transitoire ADN-Top1 est appelé complexe de clivage (Top1cc).

3) Rotation contrôlée : La suppression d'un supertour d'ADN est obtenue via la rotation du brin clivé en aval du complexe autour du brin intact. Cette relaxation se déroule selon un mécanisme de « rotation contrôlée » (Stewart et al., 1998). En effet, la rotation est ralentie par des frictions entre l'ADN et la cavité de l'enzyme (Koster et al., 2005).

4) Religation : La continuité du brin d'ADN est restaurée après religation de la cassure par réversion de la liaison covalente. Ce mécanisme résulte de la réaction inverse de transestérification via attaque de la liaison Top1-ADN 3'tyrosyl phosphodiester par l'extrémité 5'-OH libre du brin clivé (Stewart et al., 1998). La Top1 est alors dissociée de l'ADN.

Dans les conditions normales, l'étape de religation est favorisée. De ce fait, les Top1cc sont transitoires et peu détectables. De plus, l'activité de la Top1 est très rapide (environ 6000 cycles catalytiques / minute) (Seol et al., 2012).

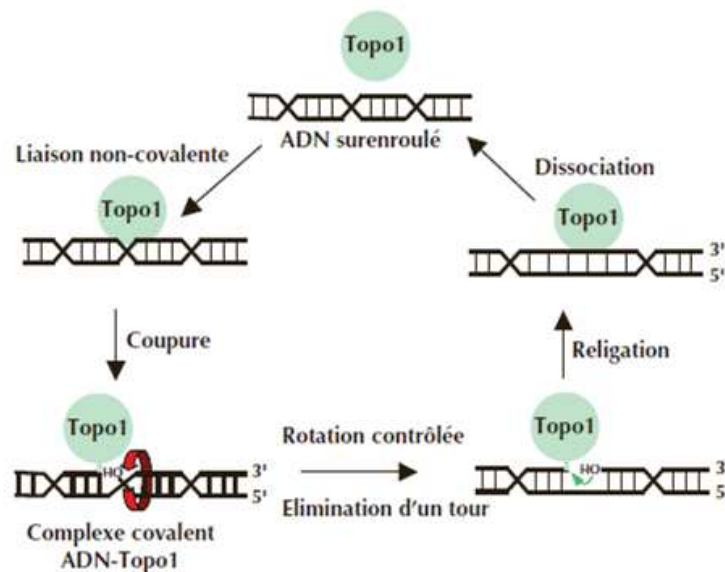


Figure 21 : Cycle catalytique de la Topo1. La relaxation de l'ADN se décompose en quatre étapes. 1) Liaison non covalente de la Topo1 à l'ADN. 2) Clivage d'un brin d'ADN par réaction de transestérification. 3) Suppression d'un supertour d'ADN par rotation contrôlée. 4) Religation et dissociation de la Topo1 et de l'ADN. (D'après Pourquier and Lansiaux, 2011).

II.2.3. Fonctions biologiques de la Topo1

L'activité de la Topo1 est essentielle pour la réplication, la transcription, la réparation de l'ADN, le modelage de la chromatine ou encore l'assemblage des nucléosomes.

II.2.3.1 Relaxation des surenroulements de l'ADN au cours de la réplication et de la transcription

Le rôle principal de la Topo1 consiste à maintenir l'ADN dans un état topologique relaxé en supprimant les surenroulements générés pendant la transcription et la réplication (Wang, 2002). La Topo1 peut relaxer les surenroulements à la fois positifs et négatifs avec toutefois une préférence pour les surenroulements positifs (McClendon and Osheroff, 2006). De par ce rôle, la Topo1 va impacter la réplication et la transcription.

1 - Réplication

La Topo1 est localisée aux origines de réplication (Abdurashidova et al., 2007; Falaschi, 2009). L'initiation de la réplication nécessite la séparation des brins parentaux de l'ADN. Des surenroulements négatifs sont générés aux origines de réplication. Des surenroulements positifs surviennent devant les fourches de réplication situées à proximité de régions où l'ADN n'est pas libre de tourner puisqu'il est rattaché à une barrière dite « topologique » comme par exemple des sites d'attachements à la matrice nucléaire. Ces surenroulements positifs sont supprimés par la Topo1, ce qui permet la progression de la fourche de réplication (Figure 22)

(Pommier et al., 2016b). L'élongation de la réplication génère la formation de surenroulements positifs (dans le sens de la double hélice) et négatifs (dans le sens inverse) devant et derrière la fourche de réplication respectivement (Pommier et al., 2016b; Wang, 2002). Ces surenroulements sont enlevés par la Top1 (Figure 22). Le chargement de la Top1 près de la fourche est facilité par le complexe de remodelage de la chromatine BAZ1B-SMARCA5 (Bromodomain adjacent to zinc finger domain 1B - SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin A5) (Ribeyre et al., 2016). Dans les cellules HCT116, la déplétion de la Top1 par ShRNA entraîne un ralentissement de la progression de la fourche de réplication (0.7 kb/min dans les HCT116 shTop1 vs 1.1 kb/min dans les HCT116 ShCtrl) et une augmentation de son nombre de pauses ou d'arrêts (Tuduri et al., 2009). Cependant, les cellules HCT116 ShTop1 compensent ces effets inhibiteurs sur l'élongation en augmentant l'initiation de la réplication (Tuduri et al., 2009).

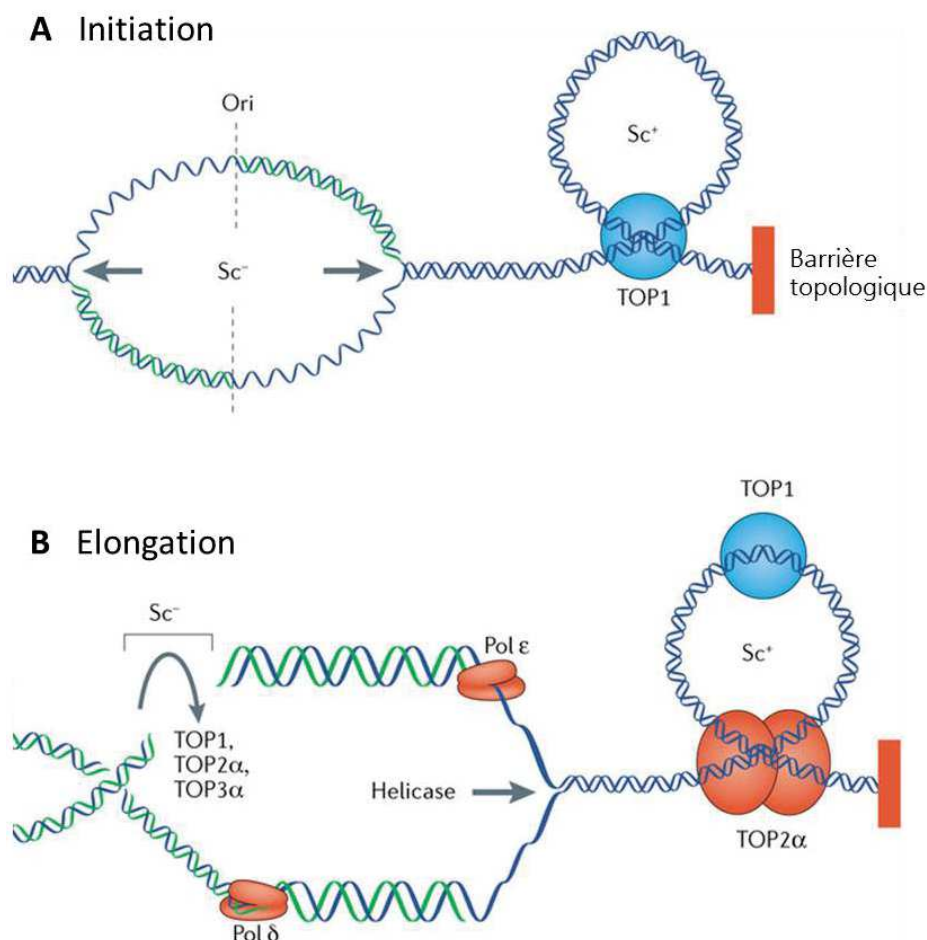


Figure 22 : Rôles de la Top1 dans la réplication. (A) La Top1 supprime les surenroulements positifs (Sc⁺) lors de l'initiation de la réplication. (B) La Top1 enlève les surenroulements positifs (Sc⁺) et négatifs (Sc⁻) situés respectivement devant et derrière la fourche de réplication pendant l'étape d'élongation de la réplication. (D'après Pommier et al., 2016b).

2 - Transcription

Chez la levure, l'absence seule de la Top1 ou de la Top2 n'a pas d'effet sur la transcription des ARNm (ARN messager) et des ARNr (ARN ribosomique) tandis que leur absence concomitante induit une diminution drastique de la synthèse des ARNm et des ARNr (Brill et al., 1987). La Top1 est préférentiellement associée aux gènes hautement transcrits (Khobta et al., 2006; Kroeger and Rowe, 1992; Zhang et al., 1988). La fonction principale de la Top1 dans la transcription est d'enlever les surenroulements créés au cours de l'élongation par son rôle dans la relaxation (Figure 23). Outre cette fonction dépendante de son activité catalytique, la Top1 régule la transcription des ARNm eucaryotes par d'autres mécanismes (Figure 23).

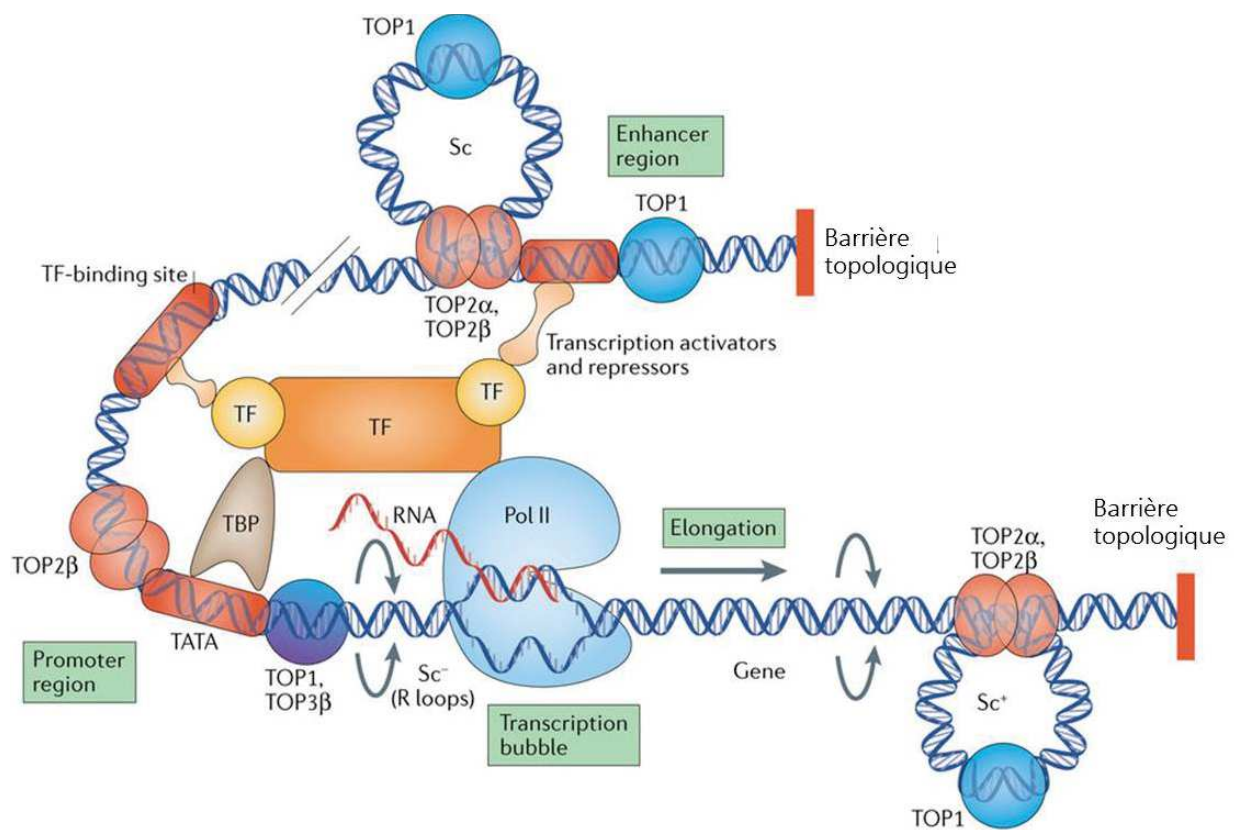


Figure 23 : Rôles de la Top1 dans la transcription. Au cours de la transcription, la progression de l'ARN pol II entraîne l'accumulation de surenroulements positifs (Sc+) et de surenroulements négatifs (Sc-) induisant la formation de R-loops devant et derrière la bulle de transcription respectivement. Ces surenroulements sont enlevés par la Top1. La Top1 augmente l'initiation de la transcription en favorisant la liaison de TBP (TATA-binding protein) à la TATA box. La Top1 est recrutée au niveau de régions activatrices et permet d'activer des enhancers de façon ligand-dépendant en générant des cassures transitoires simple-brin. TF = Facteurs de transcription (D'après Pommier et al., 2016b).

a. Initiation

La Top1 affecte la transcription de gènes en modifiant la structure de la chromatine. La Top1 maintient une faible densité des histones au niveau du promoteur afin de favoriser le recrutement de l'ARN polymérase II (ARN pol II) et d'induire la transcription. L'effet de la Top1 sur le désassemblage des nucléosomes nécessite la coopération de la protéine remodelante de la chromatine Hrp1 (Durand-Dubief et al., 2010). Le remodelage de la chromatine est également régulé par le complexe SWI/SNF (Switching defective/ Sucrose non fermentor) composées de différentes protéines notamment de l'hélicase ATP-dépendante, SMARCA4. La Top1 est recrutée à la chromatine par SMARCA4 afin de maintenir la stabilité génomique en supprimant les surenroulements négatifs et les structures d'ADN non-B formés en amont de l'ARN pol II (Husain et al., 2016). Par ailleurs, une fraction limitée de Top1 forme un complexe avec l'histone chaperonne FACT (facilites chromatin transcription) et la marque H3K4me3 (Histone 3 Lysine 4 triméthylée), associé aux promoteurs actifs à proximité des sites d'initiation à la transcription (TSS). Cette interaction a lieu sur la chromatine des ADN non-B et induit une instabilité génomique par formation de cassures de l'ADN (Husain et al., 2016).

L'initiation de la transcription débute par la reconnaissance au niveau du promoteur de la TATA box par le facteur de transcription TFIID. TFIID se lie à la TATA box par l'intermédiaire de sa sous-unité TBP. Par la suite, d'autres facteurs de transcription, notamment TFIIA, vont recruter l'ARN pol II en formant un complexe multiprotéique autour du promoteur. L'association de la Top1 avec des co-activateurs de la transcription induit la formation du complexe TFIID-TFIIA et accroît sa liaison à la TATA box via TBP, augmentant ainsi l'initiation de la transcription (Figure 23) (Shykind et al., 1997).

La Top1 faciliterait le recrutement de l'ARN pol II au niveau des sites de transcription en interagissant avec les topors (topoisomerase I-binding RS protein), des protéines nucléaires contenant un domaine « ring finger » et possédant des activités E3 ubiquitine et SUMO1 (small ubiquitin-related modifier-1) ligases (Haluska et al., 1999).

Par ailleurs, la Top1 module la transcription en agissant sur les régions activatrices. L'activité catalytique de Top1 permet d'activer des enhancers de façon ligand-dépendant en générant des cassures simple-brin (SSB) transitoires (Figure 23) (Puc et al., 2015).

b. Libération des sites de pauses

Suite à l'initiation de la transcription, l'ARN pol II s'arrête après la synthèse d'un ARN naissant de 20 à 60 nucléotides de longueur. Cette étape de pause permet d'assurer une élongation productive et le recrutement de la coiffe et des facteurs d'épissage nécessaire à la maturation de l'ARN (Liu et al., 2015; Sims et al., 2004). L'étape de libération de l'ARN pol II au niveau des sites de pause nécessite son interaction directe avec la Top1. Cet effet résulte de la stimulation de l'activité de relaxation de Top1 suite à la phosphorylation du domaine CTD (carboxyl-terminal domain) de l'ARN pol II par BRD4 (Baranello et al., 2016).

c. Elongation

Pendant l'étape d'élongation de la transcription, la progression de l'ARN pol II entraîne l'accumulation de surenroulements positifs et négatifs devant et derrière les complexes transcriptionnels respectivement (Liu and Wang, 1987). Les surenroulements positifs empêchent la progression de la transcription (Gartenberg and Wang, 1992). Les surenroulements négatifs peuvent générer la formation de structures d'ADN non-B tels que les ADN-Z (double hélice d'ADN enroulée à gauche) (Nordheim et al., 1982) et de R-loops (hybrides ARN-ADN + ADN non apparié) (Drolet, 2006; Drolet et al., 1994) qui peuvent inhiber la transcription (Huertas and Aguilera, 2003). En supprimant les surenroulements positifs et négatifs, la Top1 favorise l'élongation de la transcription (Figure 23).

d. Epissage

La Top1 peut réguler l'épissage grâce à son activité kinase spécifique (Rossi et al., 1996). La phosphorylation de facteurs d'épissage par la Top1 permet la maturation des ARN pré-messagers (Soret et al., 2003). La Top1, dans un mécanisme dépendant du facteur d'épissage ASF/SF2, prévient les interférences entre réplication et transcription et la formation de R-loops, contribuant ainsi au maintien de la stabilité du génome (Tuduri et al., 2009).

II.2.3.2 Rôles de la Top1 dans la signalisation et réparation des dommages à l'ADN

La Top1 peut être piégée par de nombreuses lésions de l'ADN endogènes ou exogènes survenues à proximité d'un site de coupure de l'enzyme (Pommier et al., 2006; Pourquier and Pommier, 2001). Ces lésions sont regroupées dans le tableau 5. L'accumulation des Top1cc

est due en majorité à une inhibition de la religation à cause du défaut d'alignement de l'extrémité 5'OH libre. Ces modifications de l'ADN produisent des complexes Top1cc réversibles ou irréversibles. Les Top1cc irréversibles sont également nommés « Top1 suicide complexes » puisqu'ils peuvent être convertis en dommages de l'ADN permanents (Pourquier et al., 1997b).

Tableau 5 : Lésions endogènes et exogènes de l'ADN induisant la formation de Top1cc

Types de lésions	Mécanisme ⁽¹⁾	Réversibilité ⁽²⁾	Références
Lésions endogènes de l'ADN			
Mésappariements de base	T	r	(Pourquier and Pommier, 2001; Pourquier et al., 1997b)
Boucles	T	ir	(Pourquier et al., 1997b)
Sites abasiques	T	ir	(Pourquier et al., 1997b)
8-oxoguanosine	B	r	(Leshner et al., 2002)
5-hydroxycytosine	?	r	(Leshner et al., 2002)
Cassures simple-brin	T	ir	(Pourquier et al., 1997a; Wang et al., 1998)
Méthylation de cytosine	F+T	r	(Leteurtre et al., 1994)
Formation d'une triple hélice	F+T	r	(Antony et al., 2004a)
Fragmentation apoptotique de la chromatine	B+T	ir	(Sordet et al., 2003; Sordet et al., 2004a; Sordet et al., 2004b; Sordet et al., 2004c)
Lésions exogènes de l'ADN			
Lésions UV	?	?	(Lanza et al., 1996; Subramanian et al., 1998)
Lésions IR	T	ir	(Pourquier et al., 1997a)
O ⁶ -méthylguanine	T	r	(Pourquier et al., 2001)
Adduits O ⁶ -dA-benzo[a]pyrène	T	r	(Pommier et al., 2000b)
Adduits N ² -dG-benzo[a]pyrène	F	ir	(Pommier et al., 2002; Pommier et al., 2000a)
Adduits N ² -dG-benzo[a]phénanthrène	T	r	(Pommier et al., 2002)
N ⁶ -éthénoadénine	T	r	(Pourquier et al., 1998)
Adduits N ² -dG-éthyl	T	r	(Antony et al., 2004b)
Adduits N ² -dG-crotonaldéhyde	T	ir	(Dexheimer et al., 2008)

(1) Mécanisme d'accumulation Top1cc : T, inhibition de la religation ; B, augmentation de la liaison ; F, Augmentation de la réaction de clivage.

(2) Réversibilité de Top1cc : r, réversible ; ir, irréversible.

(D'après Pommier et al., 2006)

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer le piégeage de la Top1 par ces lésions.

La Top1 pourrait jouer le rôle de « détecteur » de la lésion, ce qui permettrait le recrutement de protéines de réparation au niveau du dommage. Ainsi, la Top1 est impliquée dans la réparation par excision de nucléotides (NER). En effet, après lésion de l'ADN par les radiations UV, la Top1 permet le recrutement du facteur du NER, PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) (Mao and Muller, 2003). Plus récemment, il a été montré que le recrutement de la Top1 au niveau des régions activatrices de façon ligand-dépendante induit la formation de SSB. Ces cassures sont accompagnées d'un recrutement des protéines de la signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN tels que ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related), le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1), les protéines du BER (réparation par excision de base) ainsi que les protéines du c-NHEJ (classical-Non-Homologous End-Joining) Ku80 et DNA ligase IV (Puc et al., 2015). D'autre part, la Top1 peut interagir directement avec p53, ce qui entraîne le recrutement de la Top1 aux lésions UV et l'augmentation de son activité catalytique (Gobert et al., 1996; Mao et al., 2000).

Cependant, certains résultats suggèrent que la Top1 jouerait un rôle dans l'induction de l'apoptose lorsque le dommage persiste et qu'il ne peut pas être réparé. En accord avec cette hypothèse, il a été observé que la surexpression de la Top1 sensibilise les cellules de levures à divers agents endommageant de l'ADN tels que l'agent alkylant MMS, les radiations UV et les radiations ionisantes (Nitiss et al., 2001). La déplétion de la Top1 entraîne une inhibition de l'apoptose induite par la staurosporine ainsi qu'une diminution de la fragmentation de l'ADN (Sordet et al., 2004a). De plus, la Top1 serait impliquée dans l'induction de l'apoptose dépendante de p53 en réponse aux UV (Mao et al., 2000).

II.3. Les inhibiteurs de la topoisomérase I

A l'état physiologique, les Top1cc sont transitoires et peu détectables. Les Top1cc peuvent être stabilisés par de nombreuses altérations de la structure de l'ADN (Cf. partie II.2.3.2.) mais également par des inhibiteurs de Top1 camptothécines (CPT) et non-CPT (Pommier et al., 2010). Ces molécules empêchent spécifiquement, de façon réversible, la religation du brin clivé de l'ADN par l'enzyme. Cette inhibition entraîne l'accumulation de complexes Top1cc (Figure 24) (Hsiang et al., 1985; Porter and Champoux, 1989). L'inhibiteur se lie à l'interface du complexe Top1-ADN au niveau du site de clivage de l'enzyme. L'intercalation de la molécule empêche la religation du brin clivé (Staker et al.,

2005; Staker et al., 2002). Cependant, la stabilisation des complexes de clivage n'est pas toxique pour la cellule. C'est majoritairement la collision entre la fourche de réplication et le complexe Top1cc qui va aboutir à la formation de DSB. Ainsi, la cytotoxicité de ces inhibiteurs est dépendante de la phase S (Hsiang et al., 1989a). La catégorie des inhibiteurs regroupe : la camptothécine et ses dérivés (Figures 25 et 26), les indolocarbazoles, les indénoisoquinolines et les dibenzonaphthyridinones (figure 27). Certains de ces inhibiteurs sont utilisés comme anti-cancéreux.

II.3.1. Les inhibiteurs camptothécines

La CPT est un alcaloïde qui a, pour la première fois, été isolé à partir de l'écorce d'un arbre originaire de Chine, *Camptotheca acuminata* en 1966 (Wall et al., 1966). La détection d'une activité anti-tumorale a permis à la CPT d'entrer en essai clinique dans les années 1970 (Creaven et al., 1972; Gottlieb et al., 1970; Gottlieb and Luce, 1972; Moertel et al., 1972; Muggia et al., 1972). Cependant, de nombreux effets indésirables tels qu'une myélosuppression, des vomissements, nausées et cystites hémorragiques ont été rapportés. Ces résultats ont mené à une interruption des tests en phase II. Quelques années plus tard, l'intérêt de la CPT, a de nouveau, été suscité après la découverte de sa cible unique, la Top1 (Hsiang et al., 1985).

Plusieurs observations ont permis de montrer la sélectivité de la CPT vis-à-vis de la Top1. Ainsi, la délétion du gène TOP1 dans les levures les rend résistantes à la CPT (Eng et al., 1988; Nitiss and Wang, 1988). Les cellules sélectionnées pour leur résistance à la CPT présentent des mutations et/ou une faible expression du gène TOP1 (Fujimori et al., 1995; Pommier et al., 1999). Pour finir, les plantes qui produisent la CPT sont insensibles à ses effets toxiques notamment via la mutation N722S de la Top1 qui inhibe la liaison de la CPT à la Top1 et confère aux cellules une résistance à la molécule (Fujimori et al., 1995; Sirikantaramas et al., 2008).

La CPT stabilise les Top1cc en se positionnant à l'interface de la Top1 et de l'ADN dans un complexe ternaire (figure 24) (Staker et al., 2005). La CPT lie la Top1 par trois liaisons hydrogènes incluant les résidus N722, D533 et R364. La CPT stabilise préférentiellement les complexes de clivage composés d'une thymine en position -1 et d'une guanine en position +1 (Jaxel et al., 1991). L'effet de la CPT sur la stabilisation des Top1cc est rapide et réversible après le retrait de la molécule. Ainsi, sa grande spécificité et sa réversibilité ont permis d'utiliser la CPT comme outil pharmacologique dans l'étude de la Top1 et de la réponse aux dommages à l'ADN.

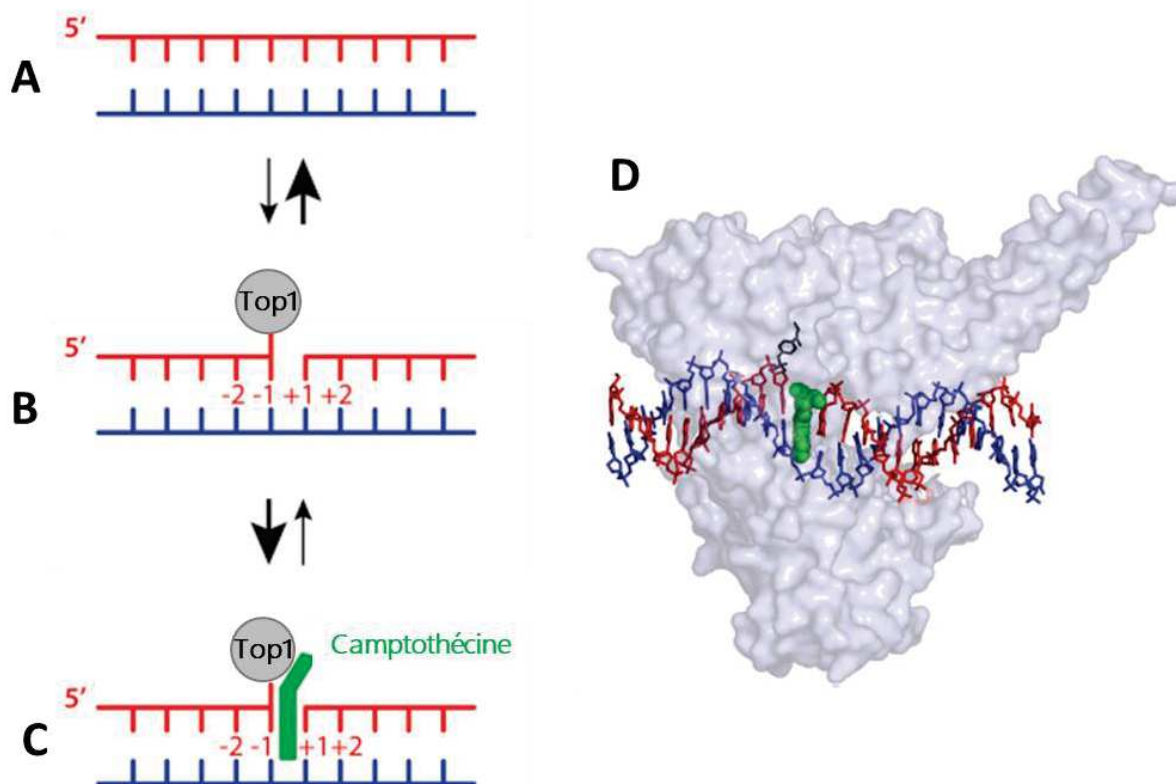


Figure 24 : Stabilisation de Top1cc par la CPT. (A) La Top1 lie l'ADN de façon non-covalente. (B) La Top1 clive l'ADN et permet l'obtention d'un complexe de clivage. (C) La CPT se positionne à l'interface de la cassure et stabilise les Top1cc. (D) Structure cristallographique du complexe tertiaire CPT-Top1-ADN. La CPT est représentée en vert, la Top1 en gris, le brin clivé de l'ADN en rouge et celui intact en bleu (D'après Pommier, 2013).

D'un point de vu physico-chimique, la CPT est peu soluble et a une faible stabilité *in vivo*. La CPT est une molécule composée de 5 cycles (A-E) avec un carbone asymétrique en position 20 dont la configuration est cruciale pour l'activité de la molécule (Figure 25). Seul l'énantiomère naturel 20S a la capacité d'inhiber Top1 (Hsiang et al., 1989b; Jaxel et al., 1989). A pH physiologique, le cycle E est en équilibre entre une forme lactone fermée active insoluble dans l'eau et une forme carboxylate ouverte plus soluble mais inactive.

L'étude de la relation structure/activité a permis le développement de molécules analogues dont le mécanisme d'action est identique à celui de la CPT. Trois dérivés hydrosolubles de la CPT sont actuellement utilisés en clinique : le topotécan, l'irinotécan ainsi que le bélotécan uniquement en Corée du Sud. Les modifications des positions 9 et 10 du cycle A et de la position 7 du cycle B permettent d'augmenter l'activité anti-tumorale de la molécule (Adams et al., 2006; Basili and Moro, 2009; Pommier et al., 1998). Les deux

dérivés hydrosolubles, topotécan et irinotécan, sont autorisées par la FDA (Food Drug Administration) et l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) (Figure 25). Le topotécan (Hycamtin®) est substitué en position 9 et 10. Ses effets indésirables sont essentiellement hématologiques (neutropénie, thrombopénie). Il peut être administré par voie orale ou par voie intraveineuse. En France, le topotécan est utilisé dans les cas suivants (ANSM, 2017) :

- en monothérapie, dans le traitement du carcinome métastatique de l'ovaire après échec d'une première ou plusieurs lignes de chimiothérapie.
- en monothérapie, dans le traitement du cancer du poumon à petites cellules chez les patients en rechute et pour lesquels la réintroduction de la première ligne de traitement n'est pas appropriée.
- en association avec le cisplatine, dans le traitement du carcinome du col de l'utérus chez les patientes en rechute après radiothérapie ou présentant un stade IV-B de la maladie, qui est défini par l'existence de métastases à distance.

L'irinotécan (Campto®) est modifié au niveau des positions 7 et 10. C'est une prodrogue qui est hydrolysée dans le foie par des carboxylestérases en SN-38, son métabolite actif (Rivory et al., 1996). Le SN-38 est désactivé par le gène UGT1A1 (UDP glucuronosyltransférase-1 polypeptide A1) (Iyer et al., 1998). La toxicité de l'irinotécan est digestive (diarrhée) et hématologique (neutropénie). Il est administré par voie intraveineuse dans le traitement des cancers colorectaux avancés dans les cas suivants (ANSM, 2017):

- en monothérapie, après échec d'un traitement ayant comporté du 5-fluorouracile (5-FU).
- en association avec le 5-FU et l'acide folinique (protocole FOLFIRI) chez les patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie antérieure et dans un stade avancé de leur maladie.

D'autres molécules comportant des modifications au niveau des cycles A et B ont été évaluées en préclinique et en essais cliniques. Le bélotécan (Camtobell®/CKD-602) (Figure 25) est actuellement en essai clinique de phase I/II dans le cancer du poumon à petites cellules, le cancer de l'ovaire et de l'utérus en monothérapie ou en association (ClinicalTrials.gov, 2017). Il est utilisé en Corée du Sud dans le traitement du cancer du poumon à petites cellules et du cancer de l'ovaire (Lee et al., 1998; Yeo et al., 2013). Les résultats des essais cliniques de l'exatécan et du rubitécan n'ont pas rapporté de réelles améliorations par rapport aux molécules présentes sur le marché. Les résultats du gimatécan

et du silatécane restent à être confirmés dans le traitement des tumeurs solides (Pourquier and Lansiaux, 2011).

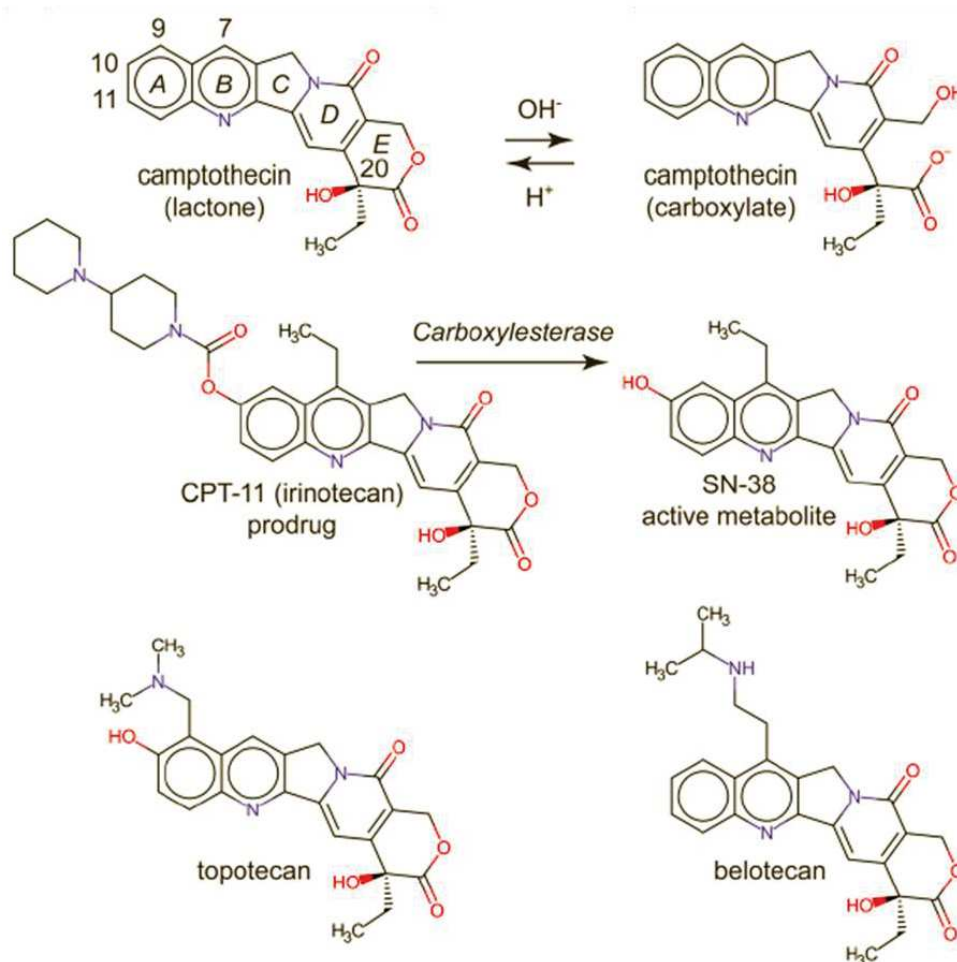


Figure 25 : Structure des inhibiteurs de la Top1 camptotécines. Représentations de la CPT sous ses conformations lactone et carboxylate. L'irinotécan (CPT-11), le topotécan et le bétotécan, analogues de la CPT utilisés dans le traitement anti-cancéreux. L'irinotécan est une prodrogue. Le SN-38 est son métabolite actif (D'après Cuya et al., 2017).

Malgré les modifications des cycles A et B, les dérivés de la CPT présentent des limitations pharmacologiques (Pommier, 2013). Du fait de leur réversibilité, l'administration de ces dérivés nécessite de longues perfusions. De plus, ces molécules sont instables et rapidement inactivées en carboxylates dans le sang. Par ailleurs, l'expression des transporteurs ABC tel que la glycoprotéine P (PgP) induit une chimiorésistance. Enfin, les effets indésirables peuvent être très sévères (neutropénie, diarrhée).

Dans le but d'augmenter la demi-vie des analogues de la CPT afin d'éviter de longues perfusions, des formes liposomales sont actuellement développées. La forme nanoliposomale PEGylé de l'irinotécan (Onivyde) a été approuvée par la FDA en combinaison avec le 5-FU et

l'acide folinique dans le traitement de l'adénocarcinome du pancréas dans un stade avancé (Passero et al., 2016).

Des molécules limitant l'ouverture du cycle E, les homocamptothécines, ont été développées par ajout d'un groupement méthylène sur le cycle E (Figure 26) (Lavergne et al., 2000; Lavergne et al., 1998). Une deuxième approche consistant à convertir le cycle E en un cycle à cinq membres a permis le développement des dérivés α -kétos (Figure 26) (Hauteffaye et al., 2003; Takagi et al., 2007). Bien que les homocamptothécines et les dérivés α -kétos soient de puissants inhibiteurs *in vitro*, les essais cliniques menés n'ont pas abouti à des résultats concluants puisque leur cytotoxicité n'est pas supérieure à celles des molécules présentes sur le marché. Par ailleurs, un autre inhibiteur permettant de stabiliser la forme lactone, le CZ48, a été développé après addition d'un groupement propionate d'éthyle sur le cycle E (Figure 26) (Liehr et al., 2000; Liu et al., 2013). Cet inhibiteur est actuellement en essai clinique de phase I dans le traitement des lymphomes ou des tumeurs solides à un stade avancé de la maladie.

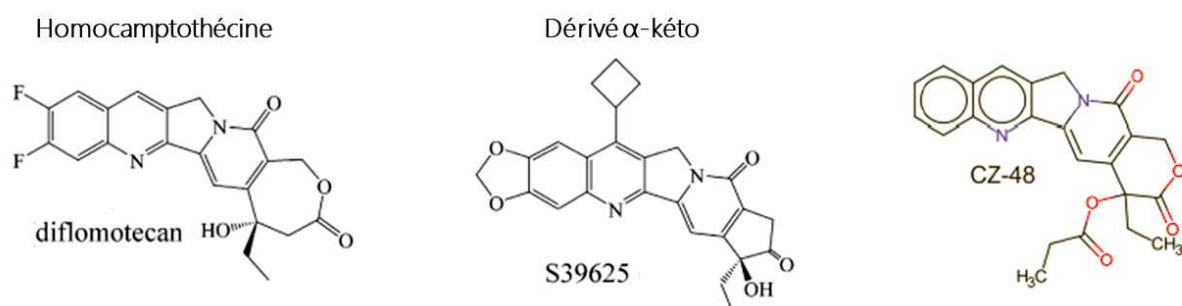


Figure 26 : Structure des dérivés de la CPT modifiés au niveau du cycle E. Représentations de l'homocamptothécine : diflomotecan, du dérivé α -kétos : S39625 et de CZ-48 (D'après Capranico et al., 2017; Cuya et al., 2017).

II.3.2. Inhibiteurs non CPT

Afin de pallier les limites pharmacologiques des CPTs, de nouveaux poisons ciblant directement la Top1cc mais possédant une structure différente de la CPT ont été développés. Parmi ces inhibiteurs, il existe trois familles : les indolocarbazoles, les indénoisoquinolines et les dibenzonaphthyridinones (Figure 27). Le premier inhibiteur testé en essai clinique a été l'édotécarin de la famille des indolocarbazoles. L'édotécarin stabilise les Top1cc plus efficacement que la CPT (Yoshinari et al., 1999). Cependant, les molécules de cette famille présentent des effets cytotoxiques indépendants de l'inhibition de la Top1 et sont donc susceptibles d'engendrer d'autres effets indésirables que ceux observés avec les dérivés de la

CPT. La famille des indénoisoquinolines augmente également la stabilité des Top1cc (Antony et al., 2007; Pommier and Cushman, 2009). Ils sont plus stables que les CPTs car ils ne possèdent pas de cycle lactone. En comparaison aux CPTs, ces molécules ciblent des séquences d'ADN différentes et n'interagissent pas avec les transporteurs ABC, ce qui limite la résistance à ces molécules. Deux dérivés, l'indotécan (LMP400) et l'indimitécan (LMP776), sont actuellement en essai clinique de phase I dans le traitement des lymphomes et des tumeurs solides avancées. La dernière famille correspond aux dibenzonaphthyridinones avec la molécule ARC-111. ARC-111 possède une meilleure cytotoxicité que les CPTs et est insensible aux transporteurs ABC (Li et al., 2003). Le dérivé Genz-644282 est en essai clinique de phase I dans le traitement des tumeurs solides (Kurtzberg et al., 2011).

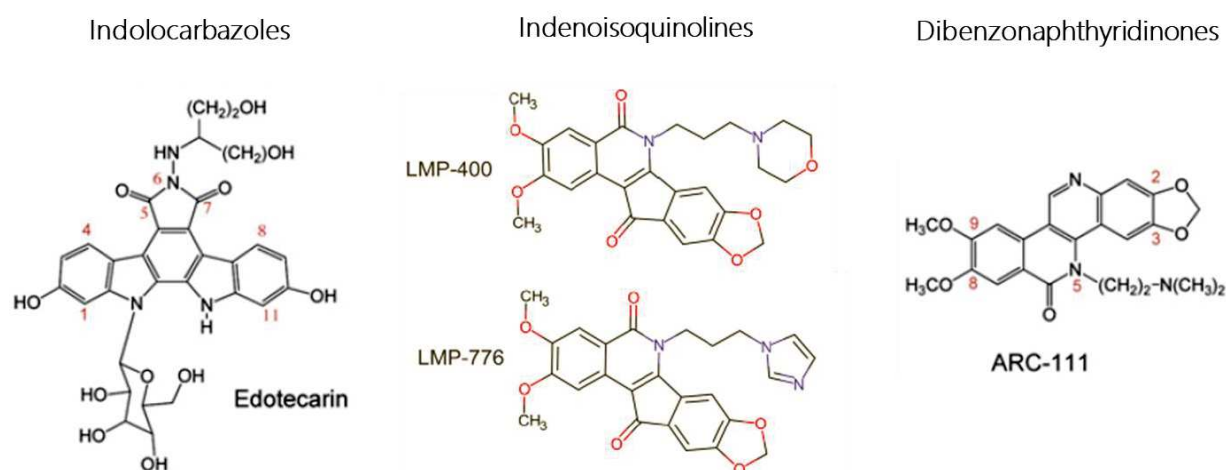


Figure 27 : Structure des inhibiteurs non-CPT. Représentations de l'indolocarbazole : édotécarin, des indénoisoquinolines : indotécan (LMP400) et indimitécan (LMP776) et du dibenzonaphthyridinones : ARC-111 (D'après Cuya et al., 2017; Pommier et al., 2010).

Il existe une catégorie d'inhibiteurs de Top1 qui ne stabilisent pas les Top1cc. Ce sont des inhibiteurs catalytiques qui agissent en bloquant deux étapes clés dans le cycle catalytique de la Top1 : (1) Ils inhibent la liaison entre la Top1 et l'ADN ; (2) Ils préviennent la formation des complexes de clivages. Ainsi, ils empêchent la formation de SSB de l'ADN nécessaire à la relaxation de l'ADN (Bailly, 2000). Cependant, ces inhibiteurs (β -lapachone, topostatine, kakuol) sont principalement des produits naturels, non spécifiques de la Top1, et agissent à des concentrations souvent élevées ($>1 \mu\text{M}$) (Castelli et al., 2013; Pourquier and Lansiaux, 2011). Récemment, une molécule appartenant à la classe des complexes des macrocycles Au^{3+} a été identifiée comme inhibiteur catalytique de la Top1 non conventionnel (Akerman et al., 2014). Ce composé s'intercale au niveau de l'ADN et empêche la formation

de Top1cc. Toutefois, cet inhibiteur n'interagit pas directement avec la Top1. Cette classe d'inhibiteurs pourrait constituer une nouvelle stratégie pour cibler la Top1.

II.4. Conséquences cellulaires de la CPT

II.4.1. Effets sur la réplication

La stabilisation des Top1cc par la CPT induit l'inhibition de la synthèse d'ADN. Cette inhibition est très rapide. Elle apparaît après quelques minutes de traitement par la CPT. Elle peut être très intense (70% de diminution par cellule après une heure de traitement) et persiste plusieurs heures (jusqu'à 8 heures) après le retrait de la molécule (Goldwasser et al., 1996; Shao et al., 1999). Plusieurs mécanismes (direct ou indirect) sont impliqués dans l'inhibition de la synthèse d'ADN par la CPT :

- La régression de la fourche de réplication médiée par PARP1 (Cf. Parties II.4.3. et III.2.5.) (Ray Chaudhuri et al., 2012)
- L'arrêt indirect de la réplication par activation des checkpoints de la phase S. L'inhibition de Chk1 restaure la synthèse d'ADN inhibée par la CPT (Seiler et al., 2007; Shao et al., 1997).
- L'inhibition de l'activité enzymatique de la thymidine kinase, enzyme impliquée dans la synthèse des nucléotides (Voeller et al., 2000).

II.4.2. Effets sur la transcription

La CPT inhibe rapidement et de façon générale la transcription des ARNm et des ARNr (Bendixen et al., 1990; Desai et al., 2003). Les mesures d'incorporation de 3H-uridine (Desai et al., 2003) et de 5-éthynyl uridine (Cristini et al., 2016) ont montré une réduction de la transcription à 20% après seulement 10 minutes de traitement des cellules par 25 μ M de CPT. Cette inhibition peut s'expliquer via l'arrêt précoce de l'élongation de la transcription après blocage de la progression de l'ARN pol II par les Top1cc stabilisés par la CPT (Bendixen et al., 1990). De plus, l'accumulation de surenroulements de l'ADN dû au blocage des Top1cc par la CPT peut également justifier cette diminution (Darzacq et al., 2007; Garg et al., 1987).

Bien que la CPT inhibe de façon globale l'élongation de la transcription, de nombreuses études ont montré que l'inhibition de la Top1 par la CPT affectait différemment l'expression

des gènes (Collins et al., 2001; Lotito et al., 2009; Solier et al., 2013; Veloso et al., 2013; Zhou et al., 2002). *Zhou et al.* a identifié des profils d'expression génique différents en fonction de la concentration en CPT. Par exemple, de faibles concentrations en CPT (20 nM) augmentent l'expression de gènes associés à la mitose et inhibent l'expression de gènes impliqués dans diverses fonctions (voies de signalisation calcium dépendantes, métabolisme cellulaire, transduction de signal...), tandis que de fortes concentrations en CPT (1 μ M) induisent une augmentation des gènes de stress associés à p53 (Zhou et al., 2002). Lotito et al. a identifié 95 gènes régulés par la CPT chez la levure. Parmi ces gènes, 73 sont inhibés par la CPT et sont impliqués dans diverses fonctions tels que le transport vésiculaire, l'organisation cellulaire ou les modifications protéiques. Par ailleurs, 22 gènes régulant la progression du cycle cellulaire, la mitose et la réplication de l'ADN ont été identifiés comme surexprimés en réponse à la CPT. Cette surexpression est en partie régulée par les facteurs de transcription Swi4 et Mbp1 (Lotito et al., 2009). Plus récemment, deux études caractérisant la réponse transcriptionnelle des gènes sous CPT ont été réalisées sur le génome entier chez l'homme en utilisant deux techniques différentes (Solier et al., 2013; Veloso et al., 2013). Par utilisation de puces exons, le groupe de *Pommier* a analysé l'expression de 18 537 gènes en réponse à la CPT. Les résultats montrent que l'expression est inhibée pour 20% des gènes et est augmentée pour seulement 5% des gènes analysés (facteur de 2-fold minimum). Il semblerait que la CPT inhibe les gènes surexprimés au niveau basal et au contraire augmente ceux qui sont peu exprimés. Par ailleurs, la probabilité qu'un gène soit inhibé augmente plus ils sont longs et possèdent un nombre d'exons élevé. De plus, il a été montré qu'au sein des gènes inhibés, 10% étaient régulés par le miR-142-3p, dont l'expression est induite par la CPT (Solier et al., 2013). L'effet du piégeage de la Top1 par la CPT sur l'inhibition de la transcription de longs gènes a été confirmé par le laboratoire de *Ljungman* par la méthode de Bru-Seq. Le Bru-Seq consiste à marquer les ARN avec le dérivé nucléosidique bromouridine (Bru), puis isoler les ARN nouvellement transcrits et enfin analyser le génome entier. Des fibroblastes ont été traités pendant 45 min avec 20 μ M de CPT avant de marquer l'ARN nouvellement transcrit par le Bru pendant 15 min. Dans ces cellules, la CPT inhibe la transcription de 1142 gènes et augmente celle de 919 gènes (facteur de 2-fold minimum). De façon intéressante, les résultats ont montré que la CPT modifie la balance survie/apoptose en induisant généralement l'expression de gènes pro-apoptotiques courts et de gènes cibles de p53 alors qu'elle réduit l'expression de proto-oncogènes et de gènes anti-apoptotiques longs (Veloso et al., 2013). En accord avec les études précédentes, une analyse par RNA-seq de l'expression des gènes dans des neurones corticaux de souris a rapporté l'effet d'un traitement

de 3 jours de topotécan sur l'inhibition transcriptionnelle des gènes longs (> 200 kb) et sur l'augmentation de celle des gènes courts (<67 kb) (King et al., 2013). De façon intéressante, King et al. a constaté que les gènes longs inhibés par le topotécan étaient également inhibés dans des cellules déficientes en TOP1, suggérant ainsi que l'inhibition de l'élongation des gènes ne dépend pas des Top1cc stabilisés mais de l'effet de Top1 (King et al., 2013). A l'inverse, la déplétion de TOP1 n'augmente pas l'expression globale des gènes courts contrairement au topotécan (King et al., 2013). Ce résultat révèle que l'augmentation de la transcription par le topotécan dépend de son effet sur la stabilisation des Top1cc et non de l'inhibition de la TOP1. Par ailleurs, cette étude a permis de révéler le potentiel rôle de la TOP1 dans le développement des neurones et des fonctions synaptiques. En effet, de nombreux gènes inhibés par le topotécan sont liés à l'autisme (King et al., 2013). En accord avec ces observations, des mutations de Top1 ont été retrouvées chez certains patients présentant des troubles du spectre autistique (Iossifov et al., 2012; Neale et al., 2012).

A ce jour, les mécanismes mis en jeu dans l'augmentation de la transcription des gènes par la CPT ont été peu étudiés. Deux études ont décrit comment le topotécan pouvait réguler positivement l'expression du gène Ube3a en inhibant le long ARN non codant (lncRNA) anti-sens Ube3a-ATS (Huang et al., 2011; Powell et al., 2013). Le topotécan augmente la formation de R-loops sur le locus de Snord116 (Powell et al., 2013). L'accumulation de R-loops induit la décondensation de la chromatine et l'inhibition de l'élongation de l'ARN pol II, ce qui mène à l'inhibition de l'expression du lncRNA Ube3a-ATS. Ube3a-ATS réprime l'expression du gène paternel Ube3a. Ainsi, en inhibant Ube3a-ATS, le topotécan induit la réexpression d'Ube3a (Huang et al., 2011; King et al., 2013; Powell et al., 2013).

D'autres mécanismes décrits dans la littérature pourraient être impliqués dans l'augmentation de la transcription des gènes par la stabilisation des Top1cc. Il semblerait que la CPT affecte la terminaison de la transcription des gènes courts en stimulant la transcription en aval du site d'addition de la queue poly(A) en 3' (Velooso et al., 2013). Ceci est en accord avec une étude qui montre que des cellules doubles mutantes Top1-Top2 ont une augmentation du taux de transcription dans la région 3' de terminaison de la transcription comparé aux cellules contrôles (Durand-Dubief et al., 2011).

De plus, la CPT augmente l'expression d'ARN enhancers (eRNA), qui correspondent à des ARN courts non codants, à partir d'éléments enhancers, comme par exemple l'enhancer FOS. Cependant, la conséquence de l'induction d'eRNA est controversée puisque le taux

d'expression du gène FOS n'est pas augmentée par la CPT malgré l'augmentation de l'eRNA (Veloso et al., 2013).

Par ailleurs, la CPT diminue la compaction de la chromatine en inhibant la liaison de l'histone linker H1 à l'ADN et en augmentant l'acétylation de l'histone H3 le long du gène. De plus, la CPT augmente l'acétylation de l'histone H4 dans les régions hautement transcrites et en région 3'. Malgré ses effets sur la relaxation de la chromatine, la CPT diminue l'expression des gènes H2AB et H3B en inhibant l'élongation de la transcription dans le corps du gène (Khobta et al., 2006). En outre, il a été montré que la mutation inhibitrice de Top1 augmente la transcription des gènes en acétylant l'histone H4 et en méthylant l'Histone 3 Lysine 4 (H3K4me) dans les régions sub-téломériques chez la levure (Lotito et al., 2008). Ainsi, il semblerait qu'en fonction de la région impliquée, la Top1 régule différemment la transcription des gènes.

La CPT pourrait modifier l'élongation de la transcription en induisant la redistribution de l'ARN pol II le long des gènes transcrits (Baranello et al., 2010; Khobta et al., 2006). Dès 5 à 10 minutes de traitement par la CPT, le taux d'ARN pol II est réduit au niveau des sites de pauses et transitoirement augmenté au niveau des exons internes des gènes c-Myc et GAPDH (Capranico et al., 2007; Khobta et al., 2006). Il a été montré que la CPT augmente la libération de l'ARN pol II du site de pause sur le gène HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) et active la transcription de l'ARN anti-sens 3'aHIF-1 α (Baranello et al., 2010). La CPT entraîne la libération du facteur positif d'élongation de la transcription P-TEFb (Positive Transcriptional Elongation Factor b) qui était séquestrée sous forme inactive au sein du complexe 7SK snRNP (small nuclear ribonucleoprotein complex) (Amente et al., 2009; Capranico et al., 2010).

II.4.3. Réparation des Top1cc irréversibles induits par la CPT

Une des conséquences de l'inhibition de Top1 par la CPT est la formation des Top1cc irréversibles.

Trois voies principales sont impliquées dans la réparation des Top1cc irréversibles (Figure 28) (Ashour et al., 2015; Pommier et al., 2006):

- Voie des hélicases (Figure 28A) : Réversion des Top1cc par religation de l'extrémité 5'OH intacte du brin clivé au brin lié à la Top1 après régression de la fourche de réplication en réponse à la CTP. Cette voie nécessite l'activité d'hélicases RecQ, tels que BLM et WRN, et

de la Top3 α (Pommier et al., 2006; Pommier et al., 2003). La régression de la fourche de réplication est médiée par l'activité de PARP1 qui inhibe RecQ1 et empêche ainsi la fourche de redémarrer avant la fin de la réparation (Berti et al., 2013; Ray Chaudhuri et al., 2012).

- Excision de la Top1 par TDP1 (Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1) (Figure 28B). La Top1 est dégradée par le protéasome et la liaison phosphodiester est clivée par TDP1 (Desai et al., 1997; Pouliot et al., 1999). TDP1 est recrutée par la protéine PARP1 avec laquelle elle forme un complexe (Das et al., 2014). TDP1 génère un lien 3'phosphate qui est ensuite hydrolysé par PNKP (Polynucleotide Kinase Phosphatase) et relié par la ligase III. TDP1, PARP1, PNKP et la ligase III forme un complexe avec XRCC1 (X-ray repair cross complementing 1) (Das et al., 2014).

- Voie des endonucléases (Figure 28C) : Excision de la Top1 de l'ADN par différentes endonucléases (Mus81-Eme1, XPF-ERCC1...). Les cassures résultantes sont réparées par HR ou c-NHEJ (Regairaz et al., 2011; Zhang et al., 2011b).

Le choix de la voie dépend, au moins en partie, de la nature de la lésion de l'ADN. Les voies des hélicases et des endonucléases réparent préférentiellement les Top1cc associés à la réplication. La voie d'excision par TDP1 répare préférentiellement les Top1cc associés à la transcription.

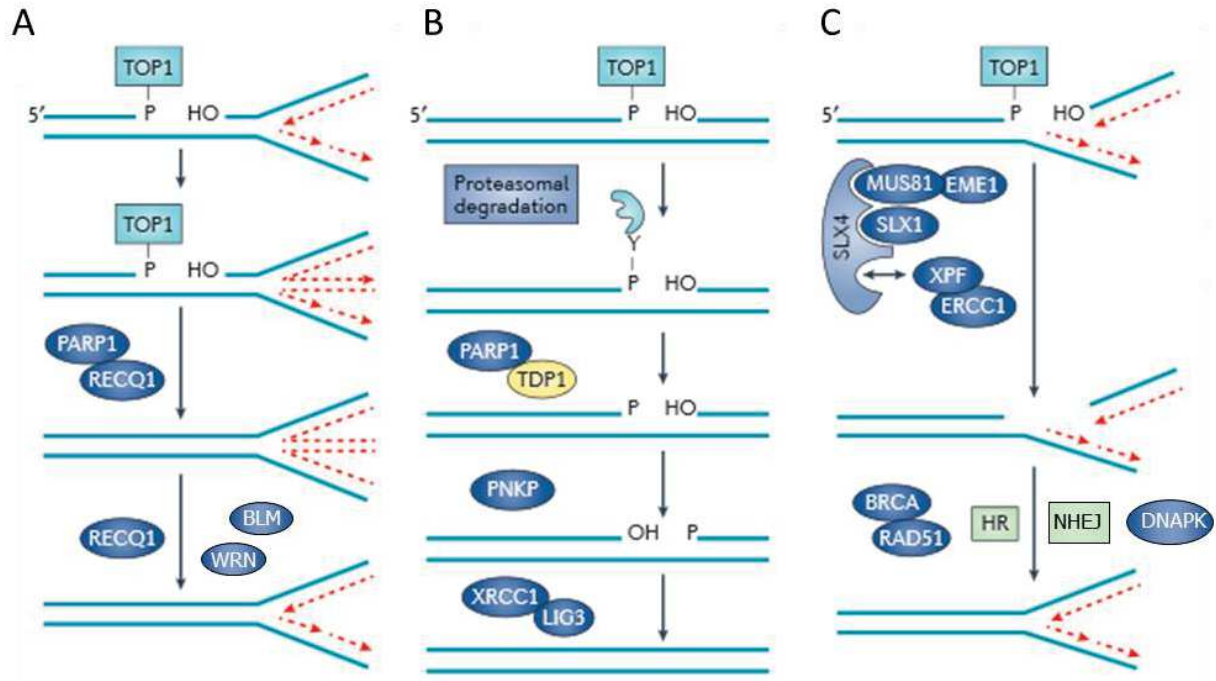


Figure 28 : Représentation schématique des trois voies impliquées dans la réparation des Top1cc induits par la CPT. (A) Voie des hélicases. Les Top1cc sont réversés par l'extrémité 5'OH après régression de la fourche de réplication. La régression et le redémarrage de la fourche nécessitent l'activité des hélicases. (B) Excision de la Top1 par TDP1. La Top1 est dégradée par le protéasome et la liaison phosphodiester est clivée par TDP1. Le lien généré est hydrolysé par PNKP et relié par la ligase III. (C) Voie des endonucléases. Les Top1cc sont excisés par différentes endonucléases et la Top1 est libérée du fragment d'ADN. La DSB résultante est réparée par HR ou c-NHEJ (Adapté d'Ashour et al., 2015)

II.4.4. Production de DSB réplicationnelles et transcriptionnelles

Les Top1cc sont normalement rapidement réversés après le retrait de la CPT (Goldwasser et al., 1996). De courtes expositions à la CPT sont généralement peu toxiques pour la cellule (< 60 min) (Holm et al., 1989). De longues expositions à la CPT sont nécessaires pour induire l'apoptose. La cytotoxicité de la CPT résulte de la conversion des Top1cc stabilisés réversibles en dommages de l'ADN irréversibles (cassure double-brin de l'ADN = DSB) après les processus de réplication et de transcription (Holm et al., 1989; Hsiang et al., 1989a; Pommier, 2006). Les DSB induites par la réplication sont le mécanisme cytotoxique majeur des inhibiteurs de la Top1 dans les cellules en division. En effet, les cellules cancéreuses sont plus résistantes à la CPT quand elles ne sont pas en phase S (Horwitz and Horwitz, 1973; O'Connor et al., 1991) ou quand elles sont prétraitées avec un inhibiteur de la réplication (Holm et al., 1989; Hsiang et al., 1989a). Ces cassures réplicationnelles sont obtenues avec des faibles concentrations en CPT (< 1 μ M) (Holm et al., 1989; O'Connor et al., 1991). A des concentrations plus élevées (> 1 μ M), les dommages induits par la CPT peuvent dépendre de la transcription (Pommier, 2006). Ainsi, la CPT peut

induire une apoptose transcription dépendante dans des cellules non-répliquatives comme par exemple des fibroblastes quiescents (Cristini et al., 2016).

II.4.4.1 DSB réplicationnelles

Deux mécanismes impliqués dans la production de cassures double-brin réplicationnelles (Rep-DSB) ont été décrits (Figure 29). Le premier mécanisme détaillé est le modèle « replication run-off » (Figure 29A) (Strumberg et al., 2000). Il correspond à la conversion des Top1cc bloqués sur le brin leader en Rep-DSB après réplication du dernier nucléotide du brin néosynthétisé par l'ADN polymérase. L'extrémité 5' du brin leader est phosphorylé et permettrait d'empêcher la religation par la Top1 (Strumberg et al., 2000). Le deuxième modèle montre que la formation des Rep-DSB est médiée par le complexe endonucléasique Mus81-Eme1 (Figure 29B) (Regairaz et al., 2011). La stabilisation des Top1cc par la CPT induit la formation de surenroulements positifs en amont de la fourche de réplication, ce qui bloque sa progression. Le clivage par Mus81-Eme1 des fourches de réplication bloquées permet de supprimer les surenroulements positifs et de rétablir la poursuite de la réplication. Ainsi, bien que ce complexe induise des Rep-DSB, il protège les cellules de la mort cellulaire induite par la CPT. En effet les cellules déficientes en Mus81 sont hypersensibles à la CPT (Regairaz et al., 2011).

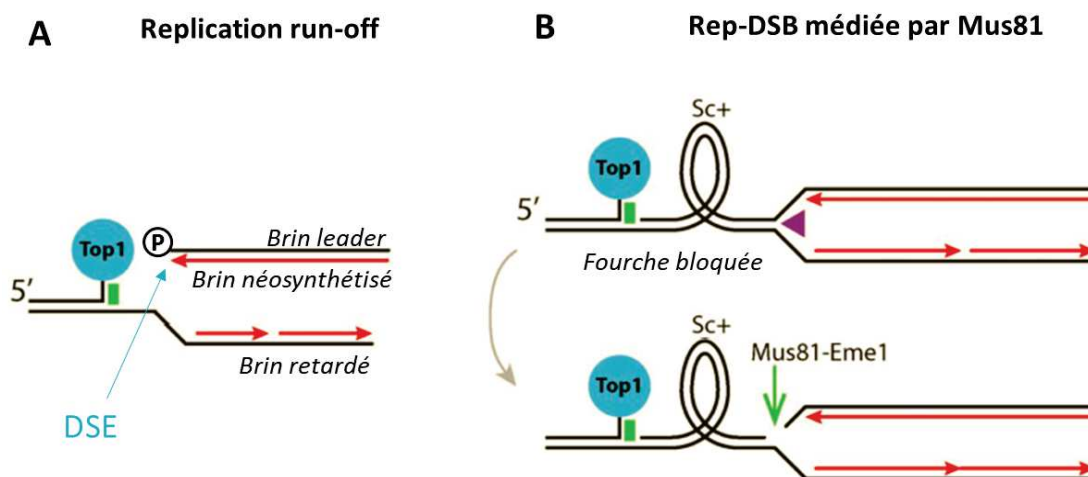


Figure 29 : Mécanisme de production des cassures double-brin réplicationnelles (Rep-DSB) par Top1cc. (A) Représentation du modèle de réplication run-off. Pendant la synthèse d'ADN, lorsque Top1cc est bloqué par la CPT (rectangle vert) sur le brin leader, l'ADN polymérase prolonge le brin néosynthétisé jusqu'au dernier nucléotide, générant ainsi une Rep-DSB, nommée « double strand-end » (DSE). L'extrémité 5' du brin leader est phosphorylé (Strumberg et al., 2000). (B) Représentation du modèle de production de Rep-DSB médiée par Mus81-Eme1. Mus81-Eme1 induit le clivage des fourches de réplication bloquées par l'accumulation de surenroulements positifs générés par la stabilisation des Top1cc par la CPT. Cette illustration représente un Top1cc bloqué sur le brin leader. Le même mécanisme s'applique lorsque Top1cc est bloqué sur le brin retardé. Le triangle violet représente l'ADN polymérase (Regairaz et al., 2011). (Adapté de Regairaz et al., 2011).

II.4.4.2 DSB transcriptionnelles

De façon similaire à la réplication, les Top1cc stabilisés par la CPT sont converties en Top1cc irréversibles après collision avec l'ARN pol II sur le brin d'ADN matrice (Wu and Liu, 1997). La fréquence des complexes irréversibles est plus importante dans les régions proches du promoteur. Ce gradient de concentrations peut être expliqué par la diminution de l'activité transcriptionnelle aux sites distants du promoteur suite à l'arrêt de l'élongation de l'ARN pol II dû à la présence de Top1cc le long de la région transcrite (Bendixen et al., 1990).

Le collision entre l'ARN pol II et Top1cc aboutit à la production de cassures simple-brin transcriptionnelles (TC-SSB) (Lin et al., 2008; Wu and Liu, 1997) mais également de cassures double-brin transcriptionnelles (TC-DSB) (Figure 30) (Cristini et al., 2016; Sordet et al., 2010; Sordet et al., 2009). Les TC-DSB dépendent de la transcription puisque l'inhibition de la transcription par le 5,6-dichloro-1-beta-D-Ribofuranosyl Benzimidazole (DRB), le flavopiridol (FLV) ou l' α -amanitine abolit la production des DSB induites par la CPT dans des cellules post-mitotiques (lymphocytes et neurones primaires) (Sordet et al., 2009). Cependant, les mécanismes de production des DSB médiés par la transcription sont relativement peu caractérisés par rapport à ceux impliqués dans l'induction des dommages par la réplication. La première SSB, qui résulte d'un défaut de réparation d'un Top1cc par la voie d'excision par TDP1, est requise pour la formation d'une DSB (Cristini et al., 2016). Plusieurs mécanismes non-exclusifs expliquant la production de la deuxième SSB aboutissant à la formation de la DSB sont envisagés. Le premier correspondrait à la présence de deux Top1cc proches situés sur les brins opposés. Cette hypothèse paraît plausible du fait de la grande concentration de Top1 dans les régions hautement transcrites (Khobta et al., 2006). Deuxièmement, il se pourrait que la SSB du brin opposé résulte de la réparation d'une lésion endogène de l'ADN qui formerait une coupure (Pourquier et al., 1997a). Enfin, il se pourrait que la deuxième SSB résulte du clivage d'une R-loop. En effet, la surexpression de la RNase H1, enzyme qui dégrade l'ARN des hybrides ADN-ARN, inhibe l'induction de γ H2AX par la CPT dans des neurones post mitotiques et des cellules Hela dans lesquelles la réplication a été bloquée par l'aphidicoline (Sordet et al., 2009). La formation de R-loops peut être causée par l'accumulation de surenroulements négatifs derrière les complexes de transcription bloqués par les Top1cc (Drolet et al., 1994). L'inhibition de l'activité SR kinase de Top1 par la CPT pourrait également favoriser la génération de R-loop en interférant avec l'épissage par hypophosphorylation des facteurs ASF/SF2 (Figure 30) (Soret et al., 2003; Tuduri et al.,

2009). Plus récemment, il a été montré que la conversion des R-loops en DSB dépend de l'activité des facteurs de la réparation des dommages par excision de nucléotides couplés à la transcription (TC-NER) tels que les endonucléases XPF et XPG (xeroderma pigmentosum group F/G) et la protéine Cockayne syndrome group B (CSB) (Sollier et al., 2014). Il se pourrait que ces facteurs TC-NER participent à la production de TC-DSB en réponse à la CPT.

De futures études permettront de caractériser le processus de production des TC-DSB et l'implication des R-loops dans ce mécanisme.

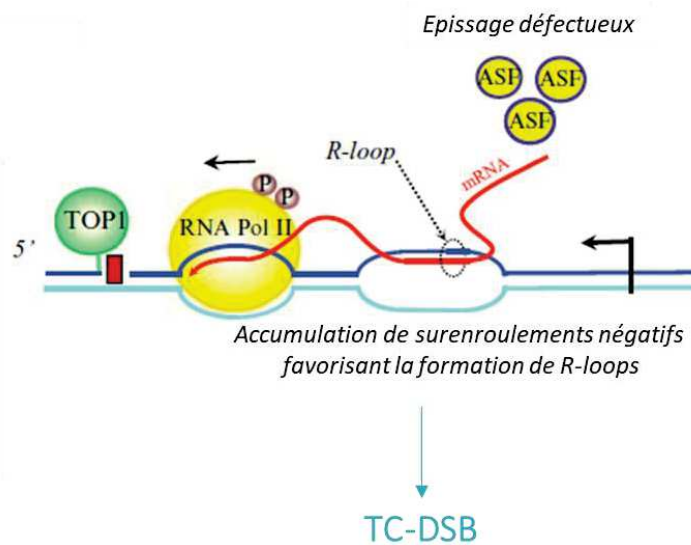


Figure 30 : Représentation schématique de la production des cassures double-brin transcriptionnelles (TC-DSB) par Top1cc. Top1cc est bloqué par la CPT (rectangle rouge) sur le brin transcrit et entre en collision avec l'ARN polymérase II. La collision convertit le Top1cc réversible en Top1cc irréversible et génère une TC-DSB. L'accumulation de surenroulements négatifs derrière l'ARN polymérase II et l'inhibition de l'activité SR-kinase de Top1 par la CPT pourraient favoriser la formation de R-loops (Adapté de Sordet and Solier, 2012).

II.4.5. Conséquences cellulaire des DSB induites par la CPT

Après formation d'une DSB induite par la CPT, des mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN (DDR = DNA Damage Response) incluant les voies de réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose sont activés (Jackson and Bartek, 2009).

II.4.5.1 Activation de la DDR en réponse aux DSB induites par la CPT

Les protéines senseurs ATR (ATM Rad3-Related Protein), ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) sont recrutées au niveau de la DSB induite par la CPT et initient la DDR avec notamment les phosphorylations de H2AX en

sérine 139 (nommée γ H2AX), de RPA (Replication protein A) et de p53 (Pommier, 2006). ATM et ATR transduisent le signal du dommage en activant leur substrats respectifs Chk1 et Chk2. Bien que Chk1 et Chk2 soient rapidement induites pas de faibles doses de CPT, il semblerait que la voie ATR/Chk1 soit majoritairement activée en réponse aux Rep-DSBs (Furuta et al., 2003). Au contraire, les TC-DSB induites par la CPT sont dépendantes de l'activation d'ATM et indépendantes d'ATR (Huang et al., 2010; Lin et al., 2008; Sakasai et al., 2010; Sordet et al., 2009). Des altérations dans l'expression de ces protéines sensibilisent les cellules cancéreuses à la CPT (Pommier, 2006).

II.4.5.2 Réparation des DSB induites par la CPT

Les DSB sont réparées majoritairement par recombinaison homologue (HR) ou par jonction d'extrémités non homologues (c-NHEJ). Lors de la collision entre un Top1cc bloqué par la CPT et la fourche de réplication, le mécanisme de « replication run-off » génère une DSB à l'extrémité de la fourche de réplication. Cette DSB, nommée « double strand-end » (DSE), est préférentiellement réparée par HR en phase S (Adachi et al., 2004; Pommier, 2006). Les mutations inhibitrices de gènes impliqués dans la HR tels que RAD51, RAD52, RAD54, BRCA2 ou encore XRCC2 confèrent aux cellules une hypersensibilité à la CPT (Ambrosini et al., 2008; Hinz et al., 2003; Maede et al., 2014; Marple et al., 2006; Nitiss and Wang, 1988; Rahden-Staron et al., 2003). Le rôle que joue c-NHEJ dans la réparation des DSB induites par la CPT n'est pas clairement défini. En effet, les cellules déficientes en DNA-PK, Ku70, Artemis ou XRCC4 sont plus sensibles à la CPT ou au topotécan (Darroudi et al., 2007; Katsube et al., 2011; Shao et al., 1999; Tian et al., 2007). D'autres études montrent, au contraire, qu'une inhibition de DNA-PK, Ku70 ou de la ligase IV induit une résistance des cellules en réponse à la CPT (Adachi et al., 2004; Maede et al., 2014; Otsuki et al., 2007).

II.4.5.3 Apoptose induite par la CPT

La CPT induit l'activation des voies classiques de l'apoptose. La voie principale impliquée dans l'activation de l'apoptose induite par la CPT est la voie intrinsèque correspondant à la libération de molécules pro-apoptotiques par la mitochondrie (Figure 31) (Sordet et al., 2003). La CPT augmente la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie (Solary et al., 2000; Solary et al., 2001). Ce processus est régulé par les protéines de la famille Bcl-2 (Delbridge et al., 2016; Gross et al., 1999). Cette famille inclue

des protéines qui sont soit anti-apoptotiques, tels que Bcl-2 et Bcl-xL, ou pro-apoptotiques, comme entre autres Bax et Bak. La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie entraîne la libération de molécules pro-apoptotiques dans le cytosol. Parmi ces protéines, AIF (apoptosis inducing factor) et l'endonucléase G induisent directement l'apoptose par condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN. D'autres molécules, incluant le cytochrome c, Smac-Diablo et Htra2-Omi, activent les caspases (Tait and Green, 2010). Le cytochrome c interagit avec la protéine Apaf-1, en présence d'ATP, ce qui permet le recrutement de la procaspase-9 dans un complexe appelé « apoptosome » (Saleh et al., 1999; Srinivasula et al., 1998). La formation de ce complexe entraîne l'autoactivation et l'activation de la caspase-9 mature, qui à son tour active d'autres caspases 9 ainsi que les caspases-3 et 7. Par la suite, la caspase-3 active d'autres caspases en aval au sein d'une cascade protéolytique (Slee et al., 1999). Simultanément avec le cytochrome c, Smac-Diablo et Htra2-Omi sont libérés afin de neutraliser l'effet inhibiteur des protéines IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins) sur les caspases-3, 7 et 9 (Vaux and Silke, 2003).

Dans certaines cellules, la CPT active la voie extrinsèque de l'apoptose impliquant le récepteur de mort Fas (appelé aussi APO-1 et CD95) (Figure 31). La liaison de Fas avec son ligand naturel FasL induit le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) qui permet à son tour le recrutement de la procaspase-8, afin de former le DISC (Death-Inducing Signaling Complex) (Chinnaiyan et al., 1995; Medema et al., 1997). Au sein de ce complexe, la caspase-8 s'autoactive et induit l'apoptose en clivant directement les caspases effectrices 3 et 7 ou indirectement via la voie mitochondriale (Scaffidi et al., 1998). La CPT augmente l'expression de Fas et FasL (Chatterjee et al., 2001; Shao et al., 2001). Cependant, l'implication de la voie extrinsèque dans ce mécanisme semble être minoritaire puisque l'inhibition de l'interaction entre FasL et Fas ne supprime pas l'apoptose induite par la CPT (Shao et al., 2001).

L'apoptose induite par la CPT met en jeu certains mécanismes dépendant de la protéine p53. p53 est impliquée dans de nombreux processus apoptotiques. Par exemple, p53 peut agir en tant que facteur de transcription des protéines pro-apoptiques de la famille Bcl-2 (Bax, Bid) ou directement au niveau de la mitochondrie dans un mécanisme indépendant de la transcription (Chipuk and Green, 2006; Mihara et al., 2003). Malgré l'implication de p53 dans les processus d'apoptose, la CPT induit l'apoptose dans les cellules leucémiques HL60 déficientes en p53 (Shimizu and Pommier, 1997; Solary et al., 1994). Ainsi, la CPT est

capable d'induire l'apoptose indépendamment de p53, notamment via le récepteur nucléaire Nur77 (Lin et al., 2004) et la kinase checkpoint Rad9 qui ciblent directement la mitochondrie (Komatsu et al., 2000).

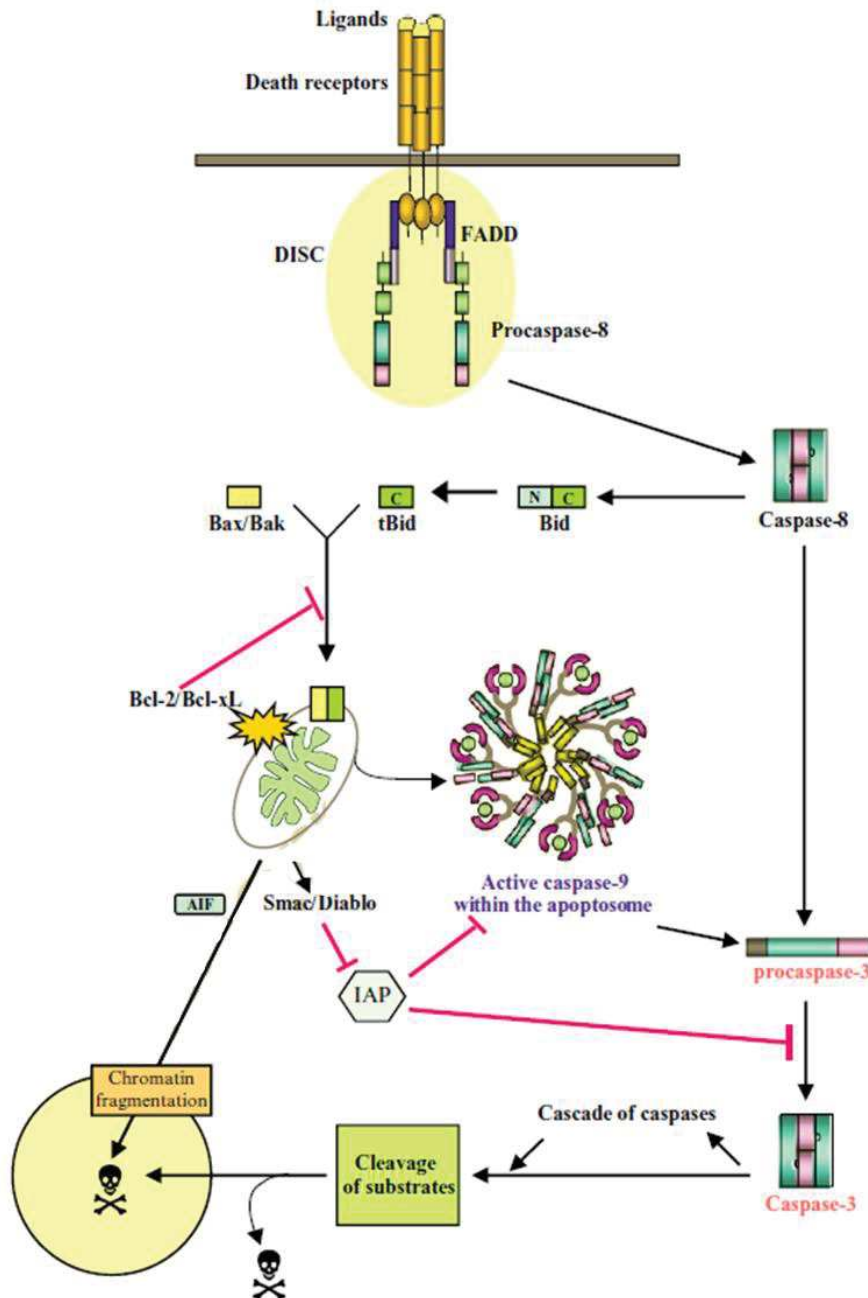


Figure 31 : Schéma des voies apoptotiques activées par la CPT. La CPT active principalement la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) de l'apoptose. Cette voie implique la libération par la mitochondrie de molécules pro-apoptotiques (AIF, cytochrome c, Smac-Diablo) aboutissant à l'activation de caspases effectrices (3 et 7) ou à la fragmentation de la chromatine. La perméabilisation de la membrane mitochondriale est régulée par les protéines de la famille Bcl-2 (pro-apoptotiques : Bax/Bak, anti-apoptotiques : Bcl-2/Bcl-xL). La voie extrinsèque est minoritaire dans l'induction de l'apoptose par la CPT. L'activation du récepteur de mort Fas par son ligand FasL induit le recrutement du complexe DISC composé de la molécule adaptatrice FADD et de la procaspase-8. L'autoclivage de la caspase 8 permet d'activer la voie mitochondriale via la protéine Bid ou d'activer les caspases effectrices (3 et 7) (Sordet and Solier, 2012).

III. La protéine PARP1

III.1. Famille PARP et PARylation

III.1.1. PARylation

L'ADP ribosylation est une modification post-traductionnelle catalysée par les ADP-ribosyl-transférases (ART), identifiée pour la première fois en 1966 par Chambon et al. (Chambon et al., 1966). Cette réaction correspond au transfert de groupements ADP-ribose chargés négativement à partir d'une molécule donneuse NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide) sur des protéines acceptrices (Figure 32). Ce mécanisme entraîne la libération concomitante d'une molécule de nicotinamide et d'un proton.

Dix-sept protéines possédant une activité catalytique ART sont regroupées au sein de la famille des poly(ADP-ribose) polymérases (PARP). En raison de leur activité transférase et non polymérase, ainsi que de la similarité avec le site actif des toxines bactériennes ART comme celle de la diphtérie, une nouvelle nomenclature a été proposée afin de désigner la famille PARP en tant que famille ARTD (diphtheria-toxin-like ADP-ribosyltransferase) (Hottiger et al., 2010).

Les protéines PARP catalysent l'addition de résidus ADP-riboses sur elles-mêmes (réaction d'automodification) ou sur des protéines acceptrices (réaction d'hétéromodification) (Figure 32). La plupart des membres de la famille PARP sont capables de transférer uniquement un seul groupement mono-ADP-ribose (MAR) sur leur protéine cible. Quatre protéines (PARP1, PARP2 et les tankyrases PARP5a et PARP5b) génèrent de longues chaînes linéaires ou ramifiées de poly(ADP-ribose) (PAR) en additionnant des unités répétées d'ADP ribose (jusqu'à 200 unités) (Figure 32). Ces réactions sont nommées MARYlation et PARylation pour mono- et poly-ADP ribosylation respectivement (Schreiber et al., 2006). La PARylation se divise en trois étapes successives (Figure 32). L'initiation consiste au transfert d'un ADP ribose sur des résidus glutamates, aspartates, lysines ou cystéines de la protéine acceptrice par une liaison ester (Vyas et al., 2014). L'élongation et le branchement correspondent à l'attachement des résidus d'ADP-ribose par des liaisons 2'1''-O-glycosidiques.

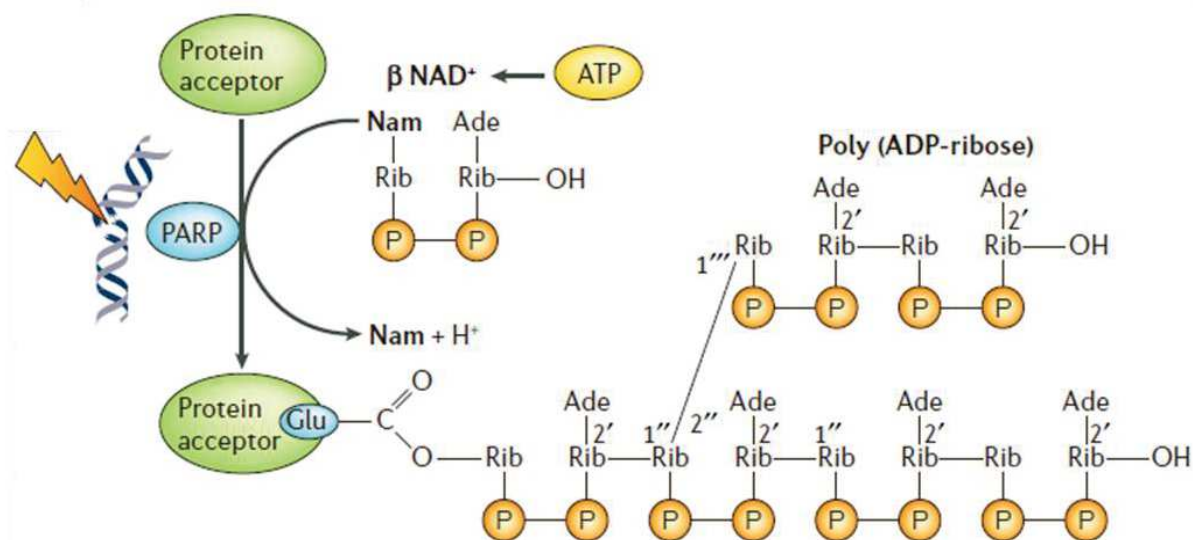


Figure 32 : Synthèse du Poly(ADP-ribose) (PAR). En réponse à une cassure de l'ADN, PARP1 et PARP2 hydrolysent le NAD^+ , libérant ainsi une molécule de nicotinamide (Nam) et un proton (H^+), et catalysent l'addition successive de résidus ADP-ribose sur des protéines acceptrices ou sur elles-mêmes. La réaction est initiée par une liaison ester covalente entre le premier ADP-ribose et l'acide aminé accepteur (glutamate, aspartate, lysine ou cystéine). Les polymères d'ADP-ribose suivant sont attachés par des liaisons 2'1''-O-glycosidiques de façon linéaire ou ramifié. Jusqu'à 200 unités d'ADP-riboses peuvent être ajoutées. Ade : adenine ; Rib : ribose, P : phosphate (D'après Schreiber et al., 2006).

III.1.2. Mécanismes de la liaison du PAR sur les protéines

La liaison covalente du PAR (PARylation) peut entraîner des modifications importantes sur la protéine acceptrice en terme de structure et de fonction. La PARylation peut ainsi réguler l'activité, la localisation en encore les interactions protéine-protéine de sa cible. La réaction de PARylation est rapidement augmentée en réponse à un dommage à l'ADN. Des études protéomiques ont permis d'identifier les protéines PARylées sous stress génotoxique (Jungmichel et al., 2013; Zhang et al., 2013). Récemment, une nouvelle technique pour détecter les protéines PARylées, sans stimulation préalable par un stress génotoxique, a été développée. Cette méthode consiste à associer un mutant de PARP1 et un analogue du NAD^+ dans des extraits nucléaires de cellules HeLa puis à détecter les protéines PARylées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) (Gibson et al., 2016). Les protéines PARylées sont majoritairement impliquées dans la réparation des dommages l'ADN, la modification de la structure de la chromatine, la régulation répllicationnelle et transcriptionnelle ou encore le métabolisme de l'ARN (Gibson et al., 2016; Jungmichel et al., 2013; Zhang et al., 2013).

De plus, les protéines PARylées peuvent établir des liaisons non covalentes avec des protéines cibles. En effet, certaines protéines possèdent un site de liaison au PAR dans leur

structure. Ce domaine de liaison au PAR permet le recrutement de protéines cibles par les protéines PARylées vers une localisation précise. Les domaines de liaison au PAR sont divisés en quatre classes : le motif de liaison au PAR (PBM = PAR-binding linear motif), le domaine macro (Macrodomain), le doigt de zinc de liaison au PAR (PBZ = PAR-binding zinc-finger) et le domaine WWE (Figure 33) (De Vos et al., 2012; Gibson and Kraus, 2012). Ces motifs de liaison reconnaissent des structures distinctes au sein du PAR.

III.1.2.1 Le motif PBM

Les PBMs sont présents dans les protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) et la réparation de l'ADN (ex : PARP1, XRCC1, ligase III, DNA-PKs, MRE11, p53), le remodelage de la chromatine (ex : Core histones), la régulation de la transcription (ex : NF-κB) et la régulation de la topologie de l'ADN (ex : Top1, Top2α et 2β) (Krietsch et al., 2013). Le PBM correspond à une séquence d'une vingtaine d'acide aminés dont le motif est : [HKR]₁-X₂-X₃-[AIQVY]₄-[KR]₅-[KR]₆-[AILV]₇-[FILPV]₈ (X= acide aminé quelconque), alternant des groupements d'acides aminés basiques et hydrophobes (Gagne et al., 2008). Dans la majorité des cas, l'interaction avec le PAR permet une relocalisation des protéines. Par exemple, la liaison de XRCC1 avec le PAR initie son recrutement au niveau d'un site de cassure simple brin (SSB) (Cf. partie IIIB1a). Bien que le PBM fut le premier domaine de liaison au PAR découvert et le plus abondant, son interaction au sein de la structure du PAR est peu caractérisée.

III.1.2.2 Le domaine macro

Le domaine macro correspond à une séquence conservée de 130 à 190 acides aminés du variant d'histone macroH2A (Pehrson and Fried, 1992). Le domaine macro est retrouvé dans la séquence de la protéine de remodelage de la chromatine, ALC1, celles des PARP 9, 14 et 15 ainsi que celles des enzymes impliquées dans le catabolisme de PAR ou de MAR, tels que PARG, TARG1, MacroD1 et MacroD2 (Ahel et al., 2009; Rosenthal et al., 2013; Slade et al., 2011). Le domaine macro lie les résidus PAR via une poche hydrophobe (Karras et al., 2005). Ainsi, il interagit avec l'ADP-ribose libre ou en position terminale du PAR (Timinszky et al., 2009).

III.1.2.3 Le domaine PBZ

Le domaine PBZ a été identifié dans deux protéines, la protéine APLF (aprataxin and PNKP like factor) impliquée dans la réparation de l'ADN et l'ubiquitine ligase CHFR (Checkpoint with fork-head associated and ring finger domains) impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire (Ahel et al., 2008; Oberoi et al., 2010). Il consiste en deux doigts de zinc de type C2H2 et de séquence consensus [K/R]xxCx[F/Y]GxxCxbbxxxxHxxx[F/Y]xH (X= acide aminé quelconque) (Ahel et al., 2008; Eustermann et al., 2010). La présence de zinc est nécessaire à la liaison du domaine PBZ au PAR (Ahel et al., 2008). Le domaine PBZ est capable de reconnaître la structure interne du PAR en liant deux adénines adjacentes et le lien glycosidique entre les jonctions ADP-ribose – ADP-ribose (Eustermann et al., 2010; Oberoi et al., 2010).

III.1.2.4 Le domaine WWE

Le domaine WWE, le dernier domaine de liaison au PAR découvert, a été dénommé ainsi en raison de la conservation des deux résidus, tryptophane (W) et acide glutamique (E) (Aravind, 2001). Il est présent dans de nombreuses PARP (PARP7, 11, 12, 13, 14) et ubiquitines-E3 ligases (RNF146, ULF, HUWE1) (Kalisch et al., 2012). Au sein du PAR, le domaine WWE reconnaît la structure iso-ADP-ribose qui correspond à l'unité du PAR contenant la liaison glycosidique ribose-ribose (Wang et al., 2012).

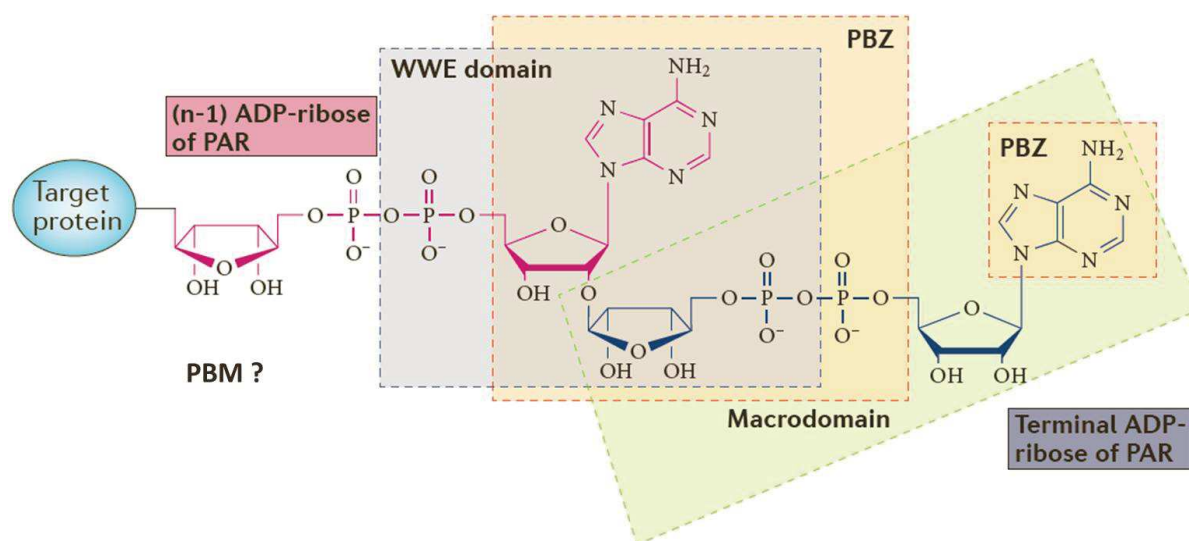


Figure 33 : Sites de reconnaissance de la structure du PAR par les domaines de liaison au PAR. Le domaine macro (macrodomain) lie les résidus PAR libres ou en position terminale. Le domaine PBZ peut lier deux adénines adjacentes ainsi que le lien glycosidique entre les jonctions ADP-ribose – ADP-ribose. Le domaine WWE reconnaît la structure iso-ADP-ribose. Le mode de reconnaissance du motif PBM, n'a pas encore été déterminé. (D'après Gibson and Kraus, 2012).

III.1.3. Catabolisme de PAR

La PARylation régle de nombreux processus biologiques dans la cellule (Cf Partie III.2.), ce qui implique le contrôle précis de son métabolisme. Le niveau de PAR peut être régulé par les PARP ou par des mécanismes de dégradation des chaînes d'ADP-ribose par diverses enzymes. Ainsi, en réponse à un dommage de l'ADN, la durée moyenne du PAR est courte (1 à 6 min) alors qu'elle est beaucoup plus longue en conditions normales (environ 7 h) (Alvarez-Gonzalez and Althaus, 1989).

Plusieurs enzymes sont impliquées dans le catabolisme de PAR (Figure 34). La poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) et l'ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3 (ARH3) hydrolysent le PAR mais sont incapables d'enlever le dernier résidu lié à la protéine cible par liaison ester, aboutissant ainsi à la formation de protéines mono-ADP-ribosylées (Brochu et al., 1994; Miwa and Sugimura, 1971; Mueller-Dieckmann et al., 2006; Oka et al., 2006; Ueda et al., 1972). Les enzymes ARH1, MacroD1, MacroD2 et TARG1/C6orf130 possèdent une activité ADP-ribosylhydrolase leur permettant de détacher le dernier résidu d'ADP-ribose lié à la protéine cible (Chen et al., 2011; Mashimo et al., 2014; Sharifi et al., 2013). Par ailleurs, contrairement aux autres enzymes, TARG1 (terminal ADP-ribose protein glycohydrolase 1)/C6orf130 est capable de libérer des chaînes entières de PAR incluant l'unité terminale d'ADP-ribose (Sharifi et al., 2013).

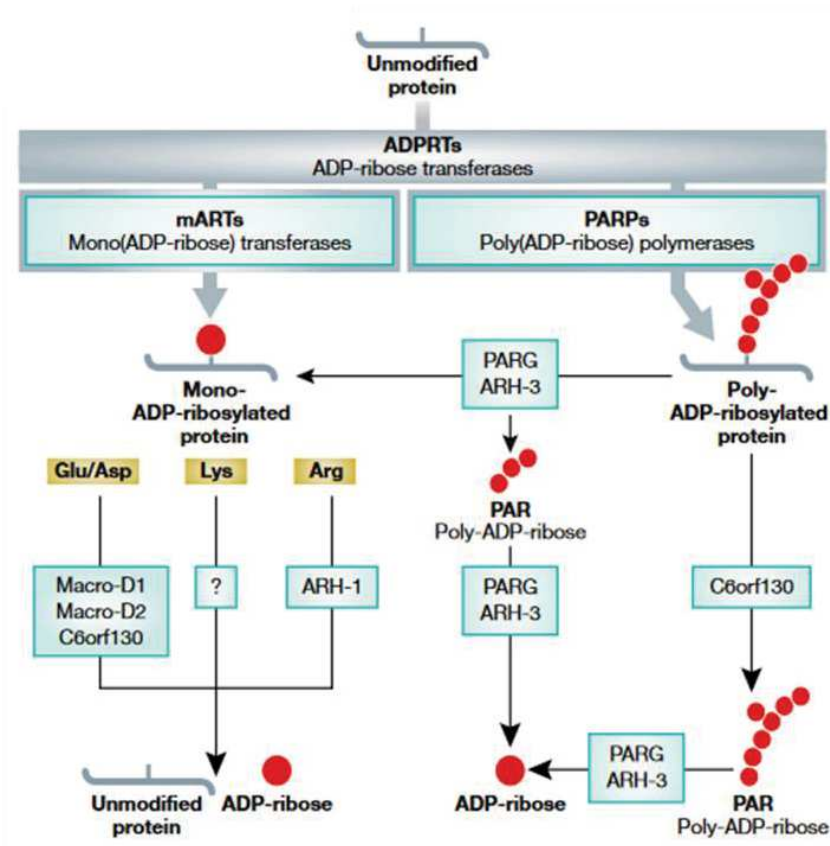


Figure 34 : Catabolisme de PAR. Les protéines PARG et ARH3 dégradent le PAR et libèrent des unités ou des polymères d'ADP-ribose. ARH1, MacroD1, MacroD2 et TARG1/C6orf130 détachent le dernier résidu d'ADP ribose spécifiquement à l'acide aminé impliqué dans la liaison avec la protéine acceptrice. TARG1/C6orf130 est capable de libérer des chaînes entières de PAR (D'après Steffen and Pascal, 2013).

III.1.4. Classifications des PARP

La protéine PARP1, membre fondateur de la famille PARP, est la plus étudiée. Après détermination de la structure tridimensionnelle du domaine catalytique de PARP1 de poulet, une région hautement conservée en C-terminal, nommée domaine ADP-ribosyl transférase (ART), a été caractérisée (Ruf et al., 1996). Ce motif a permis d'identifier les autres membres de la famille PARP en recherchant des homologues humains de PARP1 dans la base de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Ame et al., 2004).

Ainsi, les 17 membres de la famille PARP possèdent tous le domaine ART (Figure 35). Cependant, des différences dans la structure de certaines PARP entraînent une variation de leur activité catalytique. La séquence du domaine ART, essentielle à l'activité catalytique de PARP1, est constituée des trois acides aminés HYE : histidine (H862), tyrosine (Y896) et glutamate (E988) (Kleine et al., 2008) (Tableau 6). Le résidu glutamate est requis pour l'activité d'élongation de PAR et est seulement présent dans PARP1, PARP2, PARP3,

PARP4 et PARP5a et 5b (Marsischky et al., 1995). D'autres membres de la famille PARP contiennent une isoleucine, une leucine ou une tyrosine à la place du résidu glutamate 988 et exercent donc une activité de MARYlation (Kleine et al., 2008; Vyas et al., 2014). En revanche, contrairement à ce qui a été prédit par Kleine et al., PARP3 et PARP4 présentent uniquement une activité de MARYlation, suggérant ainsi que le résidu glutamate seul n'est pas suffisant pour déterminer l'activité d'élongation de PAR (Kleine et al., 2008; Vyas et al., 2014). Le résidu histidine est important pour la liaison de PARP avec le NAD⁺ (Papini et al., 1989). Les PARP9 et PARP13, pour lesquelles l'histidine et le glutamate sont substitués, sont inactives car elles ne peuvent pas fixer le NAD⁺, ni catalyser le transfert d'ADP-ribose (Aguilar et al., 2005; Kleine et al., 2008).

Tableau 6 : Résumé de l'activité catalytique des PARP (D'après Vyas et al., 2014).

Activité	PARP	Autres noms	Motif catalytique
PAR	1	PARP ARTD1	H-Y-E
	2	ARTD2	H-Y-E
	5a	TNKS1 ARTD5	H-Y-E
	5b	TNKS2 ARTD6	H-Y-E
MAR	3	ARTD3	H-Y-E
	4	vPARP ARTD4	H-Y-E
	6	ARTD17	H-Y-I
	7	tiPARP ARTD14	H-Y-I
	8	ARTD16	H-Y-I
	10	ARTD10	H-Y-I
	11	ARTD11	H-Y-I
	12	ARTD12	H-Y-I
	14	BAL2 ARTD8	H-Y-L
	15	BAL3 ARTD7	H-Y-L
	16	ARTD15	H-Y-Y
Inactive	9	BAL1 ARTD9	Q-Y-T
	13	ZC3HAV1 ARTD13	Y-Y-V

TNKS (tankyrase), vPARP (vault PARP), tiPARP (TCDD inducible PARP), BAL (B cell aggressive lymphoma), ZC3HAV1 (zinc finger CCCH-type antiviral 1).

Une seconde classification des PARP consiste à regrouper les membres partageant une fonction ou un domaine semblable (Figure 35). Quatre groupes ont été définis : les PARP ADN-dépendantes (PARP1-3), les tankyrases (PARP5a et 5b), les PARP à doigt de zinc de type CCCH (PARP7, 12 et 13) et les macro-PARP (PARP9, 14 et 15) (Barkauskaite et al., 2015; Schreiber et al., 2006). Les six PARP restantes ne peuvent pas être classées selon le modèle déterminé.

Ce travail s'intéresse plus particulièrement aux PARP ADN-dépendantes et notamment à PARP1. La structure et les fonctions biologiques de PARP1 seront majoritairement développées dans la suite de ce manuscrit.

III.1.4.1 Les PARP ADN-dépendantes

Les PARP ADN-dépendantes sont impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN. La plupart des PARP en conditions normales sont inactives. En effet, dans les cellules à l'état basal, le niveau de PARylation est faible (Ji and Tulin, 2010). PARP1, PARP2 et PARP3 sont activées en réponse aux cassures de l'ADN (Ame et al., 1999; Ame et al., 2004; Benjamin and Gill, 1980; Rulten et al., 2011). Dans les souris, le knock-out simple de PARP1 ou PARP2 seul est viable, alors que le double knock-out de PARP1 et PARP2 est létal au stade embryonnaire (Menissier de Murcia et al., 2003).

1- PARP1

PARP1 est une protéine de 113 kDa, localisée dans le noyau et responsable de près de 90% de la production de PAR totale (Ame et al., 1999; Jungmichel et al., 2013). Sa structure, plus complexe que celle de PARP2 ou PARP3, peut être subdivisée en trois parties : le domaine de liaison à l'ADN en N-terminal, le domaine central d'automodification et le domaine catalytique en C-terminal (Figures 35 et 36).

Le domaine de liaison à l'ADN permet à PARP1 d'interagir avec diverses structures d'ADN via deux doigts de zinc, Zn1 et Zn2, et un domaine de liaison au zinc (ZBD ou Zn3) (Cf partie IIIB1) (Langelier et al., 2011). La région N-terminale contient également un signal de localisation nucléaire (NLS) qui dirige PARP1 vers le noyau et contient un site de clivage ciblé par la caspase 3 au cours du processus apoptotique (Oliver et al., 1998; Schreiber et al., 1992).

Le domaine central d'auto modification BRCT (BRCA1 C-Terminus) joue un rôle dans l'interaction de PARP1 avec ses partenaires protéiques.

Le domaine catalytique comprend le domaine WGR (Tyr-Gly-Arg), notamment impliqué dans la détection des DSB et la liaison aux ARN, ainsi que le domaine ART (Langelier et al., 2012)

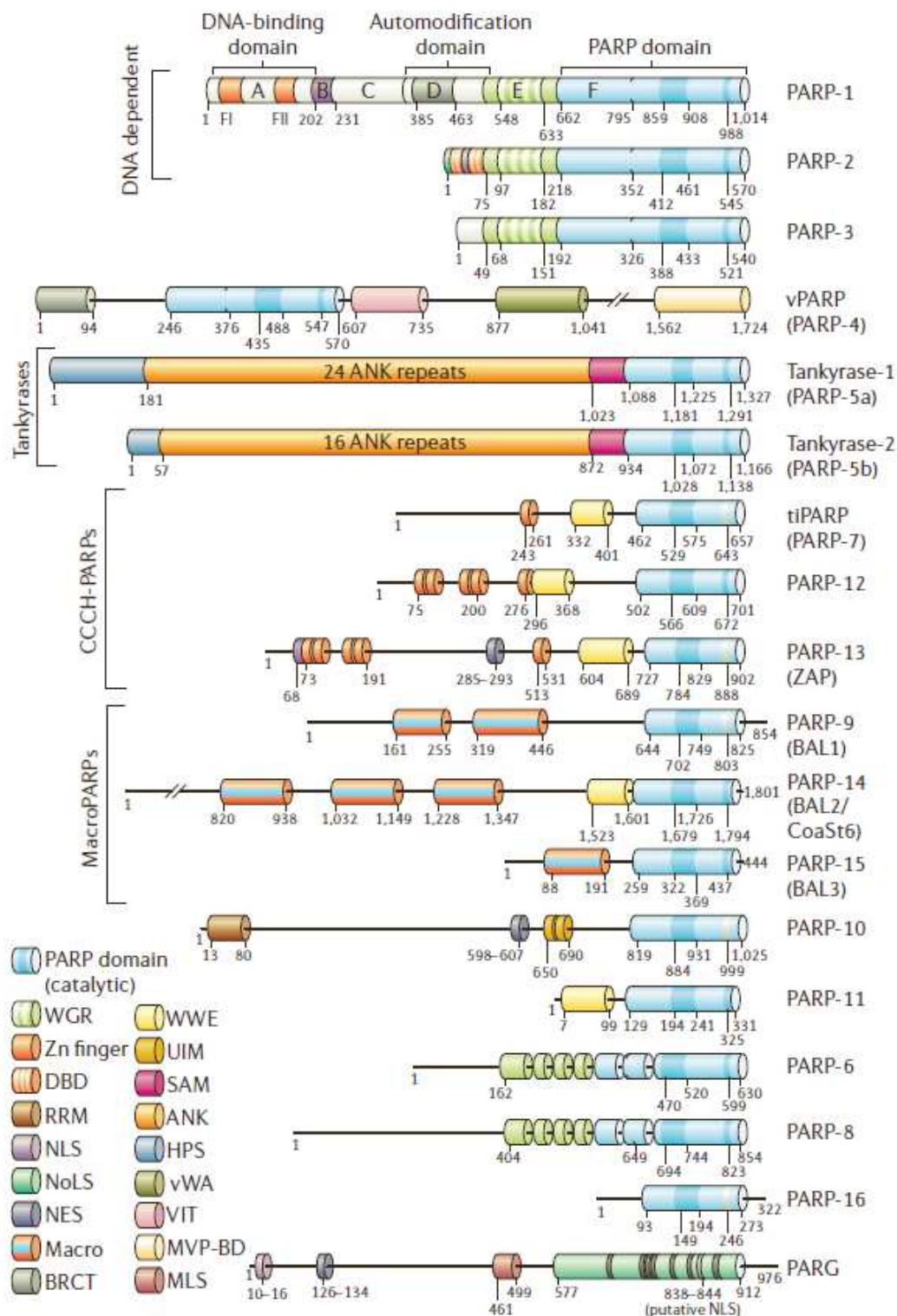


Figure 35 : Structures des domaines des membres de la famille PARP et de PARG. Les domaines suivants sont représentés : PARP domain : domaine ART (ADP-ribosyl transferase), WGR : résidus conservés Tyr-Gly-Arg, Zn : zinc finger (doigts de zinc), DBD : DNA-binding domain (domaine de liaison à l'ADN), RRM : RNA-binding motif (motif de liaison à l'ARN), Macro : domaine macro, BRCT : BRCA1 C-terminus, WWE : résidus conservés Tyr-Glu, UIM : Ubiquitin-Interacting Motif (motif d'interaction à l'ubiquitine), SAM : sterile alpha motif, ANK : ankyrine, HPS : résidus His, Pro et Ser, vWA : facteur de von Willebrand de type A, VIT : vault inter- α -trypsin, MVP-BD : site de liaison de la protéine MVP (major vault protein). NLS : nuclear localization signal (signal de localisation nucléaire), NoLS : nucleolar localization signal (signal de localisation nucléolaire), NES : nuclear export signal (signal d'exportation nucléaire), MLS : mitochondrial localization signal (signal de localisation mitochondriale). Le nombre d'acide aminés de chaque protéine est indiqué (D'après Schreiber et al., 2006).

PARP1 est principalement activée par son interaction avec l'ADN endommagé (D'Amours et al., 1999). Par ailleurs, PARP1 peut également être activée après liaison aux nucléosomes (Kim et al., 2004) ou à l'ADN non endommagé (Kun et al., 2002).

Les principales fonctions biologiques de PARP1 seront décrites dans la partie III.2.

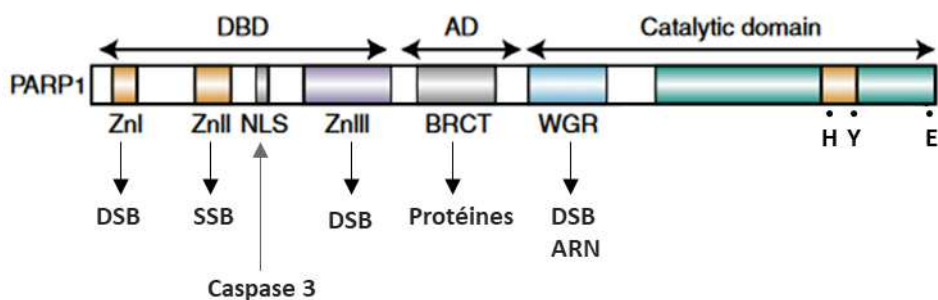


Figure 36 : Structure des domaines de PARP1 humaine et leurs fonctions associées. PARP1 est divisée en trois parties : le domaine de liaison à l'ADN (DBD = DNA-binding domain), le domaine central d'automodification (AD) et le domaine catalytique. Les domaines Zn1, Zn3 et WGR sont impliqués dans la détection des DSB et le domaine Zn2 dans celle des SSB. Les domaines BRCT et WGR participent à la liaison aux protéines et aux ARN respectivement. Le domaine NLS contient le site de clivage par la caspase 3. Les trois acides aminés HYE essentiels à l'activité catalytique de PARP1 sont indiqués (Adapté de Cseh et al., 2017).

2- PARP2 et PARP3

Comme PARP1, PARP2 et PARP3 sont retrouvées dans le noyau mais sont cependant moins exprimées. De plus, PARP2 est responsable de seulement 5 à 10 % de la production de PAR totale (Ame et al., 1999). PARP1, PARP2 et PARP3 sont composées chacune du domaine WGR et du domaine ART. Cependant, les séquences N-terminale de PARP2 et PARP3 sont plus petites (70 et 40 acides aminés, respectivement). Contrairement à PARP1, cette région n'est pas impérativement requise pour la liaison de PARP2 ou PARP3 à l'ADN ou pour leur activation. C'est la présence du domaine WGR qui est importante pour leurs fonctions ADN-dépendantes. Ce domaine facilite leur liaison à l'ADN et la déstabilisation de leur sous-domaine régulateur HD du domaine catalytique (Helical Subdomain), étape essentielle à la régulation de l'activité catalytique (Langelier et al., 2014).

PARP1 et PARP2 partagent une grande homologie de séquence et présentent des fonctions communes. Par exemple, ces deux protéines jouent un rôle dans la réparation des lésions simples brins ou encore dans le redémarrage des fourches de réplication bloquées (Bryant et al., 2009; Schreiber et al., 2002). De plus, comme PARP1, il semblerait que

PARP2 soit impliquée dans la réparation des DSB. En effet, il a été montré que PARP2 favoriserait le processus de réparation des DSB par recombinaison homologue (HR : Homologous Recombination) par rapport à celui de jonction d'extrémités non homologues (c-NHEJ : classical Non-Homologous End-Joining) (Fouquin et al., 2017). PARP2 inhibe la c-NHEJ en limitant l'accès de 53BP1 (p53-binding protein 1) au site de cassure et promeut la HR en induisant la résection de la cassure. PARP2 possède également des fonctions uniques notamment dans la différenciation cellulaire tels que la spermatogénèse (Dantzer et al., 2006), l'adipogenèse (Bai et al., 2007) et la maturation lymphocytaire (Filliol et al., 2017; Nicolas et al., 2010; Yelamos et al., 2006) ainsi que dans la maintenance de l'intégrité des télomères (Dantzer et al., 2004). De plus, PARP2 a un rôle protecteur vis-à-vis des recombinaisons illégitimes et permet ainsi de supprimer les translocations chromosomiques d'oncogènes tel que c-myc (Robert et al., 2009).

PARP3 jouerait un rôle dans la voie de réparation des DSB par c-NHEJ en facilitant le recrutement de Ku70/Ku80, ce qui limite la résection de la cassure, étape initiale du processus de réparation par HR (Beck et al., 2014). De plus, PARP3 entraîne l'accumulation à proximité de la cassure de la protéine APLF (Aprataxin-and-PNKP-Like Factor), accélérant ainsi la ligation de la cassure par XRCC4 et la ligase IV au cours du c-NHEJ (Fenton et al., 2013; Rulten et al., 2011). A l'inverse de PARP2, PARP3 orienterait le choix de la voie de réparation des DSB vers le mécanisme de c-NHEJ plutôt que celui de HR, en facilitant l'accès de 53BP1 au dépend de celui de BRCA1 (BReast Cancer type 1 susceptibility protein) (Beck et al., 2014). En outre, il a été montré que PARP3 régule négativement la commutation de classe des immunoglobulines (Robert et al., 2015). Plus récemment, une nouvelle fonction de PARP3 dans le contrôle de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) induite par le TGFβ et l'acquisition de propriétés de cellules souches (« stemness ») a été décrite (Karicheva et al., 2016).

III.1.4.2 Les tankyrases

Les tankyrases 1 et 2 (TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase), appelées également PARP5a et PARP5b, sont capables de PARyler les protéines (Tableau 6). Les tankyrases partagent deux domaines uniques distincts. La première région est formée de 24 répétitions d'ankyrine (ANK) en N-terminal et est impliquée dans l'interaction avec les partenaires protéiques (Figure 35). L'autre région correspond au domaine SAM (Sterile Alpha

Motif) et contrôle l'hétéro- ou l'homo-dimérisation des tankyrases (Figure 35) (Hsiao and Smith, 2008; Karlberg et al., 2013).

La tankyrase 1 a initialement été identifiée pour son rôle dans la régulation de l'élongation des télomères. La PARylation de la protéine associée aux télomères TRF1, par la tankyrase 1, augmente l'accès de la télomérase aux télomères (Smith and de Lange, 2000; Smith et al., 1998). La tankyrase 2 participe également à l'homéostasie des télomères (Cook et al., 2002).

Les tankyrases sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires tels que la mitose en régulant l'assemblage du fuseau mitotique et la maturation des centrosomes (Chang et al., 2009; Chang et al., 2005; Ozaki et al., 2012). Elles jouent un rôle dans le développement embryonnaire et l'homéostasie des tissus adultes en régulant la voie Wnt/ β -caténine (Huang et al., 2009). La PARylation de l'axine entraîne sa dégradation dépendante du système ubiquitine/protéasome, ce qui favorise la libération de β -caténine et l'expression de ses gènes cibles (Zhang et al., 2011a).

III.1.4.3 Les PARP à doigt de zinc de type CCCH

PARP7, PARP12 et PARP13 partagent au moins un domaine de doigt de zinc de type Cys-X₇₋₁₁-Cys-X₃₋₉-Cys-X₃-His (CCCH) et un domaine WWE (Figure 35) (Schreiber et al., 2006). PARP7, PARP12 et PARP13 possèdent une activité anti-virale par inhibition de la réplication virale (Atasheva et al., 2012; Gao et al., 2002; Guo et al., 2004). PARP7 est induite par la dioxine cancérigène TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine) via le récepteur nucléaire AHR (Aryl hydrocarbon receptor) et en retour régule négativement le récepteur (Ma et al., 2001; MacPherson et al., 2013). PARP12 contrôle l'inflammation en régulant la traduction des ARNm et la signalisation NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) (Welsby et al., 2014). PARP13 régule la réponse antivirale en dégradant les ARN viraux et en stimulant la réponse immunitaire innée (Hayakawa et al., 2011; Zhu and Gao, 2008). Récemment, il a été montré que PARP13 forme un complexe tertiaire avec PARP1 et la protéine HSF1 (Heat Shock transcription Factor 1) et régule ainsi la réparation de l'ADN et l'expression génique (Fujimoto et al., 2017).

III.1.4.4 Les macro-PARP

Les macro-PARP (PARP9, PARP14 et PARP15) possèdent au moins deux domaines macro qui est un domaine de liaison au PAR (Figure 35) (Cf partie IIIA2b). Les macro-PARP sont également appelées les protéines BAL (B-aggressive lymphoma) pour leur implication dans les lymphomes diffus à larges cellules B (Aguiar et al., 2005). En effet, PARP9 est surexprimée dans ces tumeurs. La surexpression ectopique de PARP9 augmente la migration des lymphocytes (Aguiar et al., 2000). PARP9, ne possédant pas d'activité d'ADP-ribosylation *in vitro*, utilise ses domaines macro pour se lier aux protéines PARylées (Tableau 6) (Karras et al., 2005). PARP9 est impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN. L'activation de PARP1 permet le recrutement de PARP9 et de son partenaire, l'ubiquitine ligase E3, BBAP (B-lymphoma and BAL-associated protein) au site de la DSB. Ceci entraîne l'ubiquitylation dépendante de BBAP et l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN par recrutement de p53BP1 et BRCA1 (Yan et al., 2013). Le domaine macro de PARP14 permet sa liaison avec des protéines MARylées, tels que PARP10 (Forst et al., 2013). Les macro-PARP régulent la transcription. PARP9 possède une activité répressive de la transcription, tandis que PARP14 joue le rôle de cofacteur du facteur de transcription Stat6 (Aguiar et al., 2005; Mehrotra et al., 2011). PARP15 est relativement peu étudiée. Elle est localisée dans les granules de stress cytoplasmique et régule l'expression post-transcriptionnelle des gènes au côté d'autres PARP (tankyrase 1, PARP12, PARP13) (Leung et al., 2011).

III.1.4.5 Les autres PARP

Les six PARP restantes (4, 6, 8, 10, 11 et 16) possèdent divers domaines. PARP4 est un composant du complexe ribonucléique Vault, impliqué dans le transport intracellulaire et dans la résistance multiple aux anti-cancéreux (MDR : multidrug resistance) (Figure 35) (Kickhoefer et al., 1999; Wojtowicz et al., 2017). PARP10 contient un motif NES d'exportation nucléaire (nuclear export signal) et est donc localisée dans le noyau et le cytoplasme (Figure 35). Elle contient également des motifs de liaison à l'ARN et à l'ubiquitine (Figure 35). PARP10 régule la prolifération cellulaire par interaction avec le proto-oncogène et régulateur transcriptionnel, c-Myc (Yu et al., 2005). A ce jour, les structures et fonctions des protéines 6, 8, 11 et 16 ont été peu décrites. PARP16 est associée avec le réticulum endoplasmique et MARyle le facteur de transport nucléaire Kapβ1 (Di

Paola et al., 2012). PARP6 joue le rôle de suppresseur de tumeur dans le cancer colorectal en inhibant la prolifération cellulaire (Tuncel et al., 2012).

III.2. Les fonctions biologiques de PARP1

Dans ce chapitre, je développerai quatre fonctions essentielles de PARP1 : la réparation des lésions de l'ADN, le remodelage de la chromatine ainsi que les régulations de la transcription et de la réplication.

III.2.1. Rôles de PARP1 dans la réparation des dommages à l'ADN

III.2.1.1 Rôles de PARP1 dans la réparation des lésions simple-brin de l'ADN

Les lésions simple-brin de l'ADN peuvent provenir de l'action d'agents exogènes comme les radiations ionisantes, les radiations UV ou encore la stabilisation des Top1cc par la CPT (Figure 37) (Curtin, 2012). Ces lésions peuvent également résulter de la modification de bases, notamment de l'oxydation et de l'alkylation des bases ou encore de la production de sites abasiques (Figure 37) (Curtin, 2012). Les dommages simple-brin de l'ADN sont réparés principalement par trois systèmes : réparation par excision de base (BER : base excision repair), réparation par excision de nucléotide (NER : nucleotide excision repair), et réparation des mésappariements (MMR : mismatch repair). Parmi le système NER, deux mécanismes sont à distinguer. Le mécanisme appelé GG-NER (Global genome NER) répare les lésions sur l'ensemble du génome, alors que le TC-NER (Transcription coupled NER) répare seulement les lésions bloquant la transcription. Le choix du système de réparation des lésions simple-brin de l'ADN dépend de la source du dommage (Figure 37). De plus, la réparation des Top1cc irréversibles fait intervenir des systèmes de réparation spécifiques décrits dans la partie II.4.3. Au sein de ces différents systèmes, PARP1 est impliquée dans la réparation des lésions par le BER et le GG-NER ainsi que dans la réparation des Top1cc irréversibles.

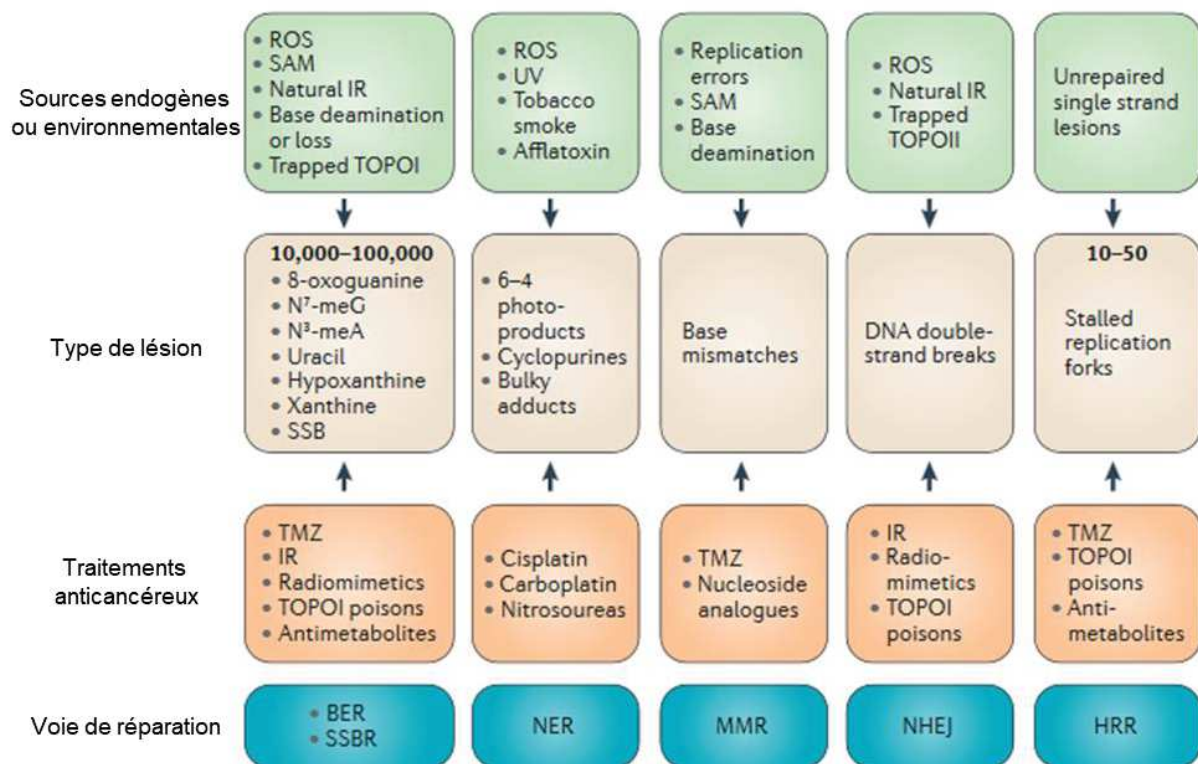


Figure 37 : Les sources de dommages à l'ADN et leurs voies de réparation associées. Sources endogènes et environnementales (cases vertes) et traitements anticancéreux (cases oranges) endommageant l'ADN avec leurs lésions de l'ADN correspondantes (cases beiges). Pour certains types de dommages, le nombre approximatif de lésions survenant spontanément dans la cellule chaque jour est indiqué. Les voies de réparations (cases bleues) sont associées au type de dommage qu'elles réparent. ROS : reactive oxygen species, SAM : S-adenosyl methionine, IR : ionizing radiation, TOPO : topoisomerase, UV : ultraviolet, TMZ, temozolomide. BER : base excision repair, SSBR : single-strand break repair, NER : nucleotide excision repair, MMR : mismatch repair, NHEJ : non-homologous end joining, HRR : homologous recombination repair (D'après Curtin, 2012).

1- Rôles de PARP1 dans la réparation des SSB par le BER

Les dommages des bases sont réparés par le BER. Dans le BER, la base endommagée est reconnue par une ADN-glycosylase qui clive la liaison N-glycosidique entre la base et le sucre. Ce clivage génère la formation d'un site abasique ou AP (Apurinique-Apyrimidinique) qui est pris en charge par une AP endonucléase qui génère une SSB. Le BER est initié par un complexe de protéine formé entre autres de XRCC1 (X-ray repair cross complementation group 1), de la ligase III et de PNKP (polynucleotide kinase-phosphatase) (Figure 39). Après recrutement des protéines, la SSB est réparée soit par la voie de la brèche courte (short patch BER), soit par la voie de la brèche longue (long patch BER). Dans le cas du short patch BER, le seul nucléotide est remplacé par l'ADN polymérase β , puis la ligation est réalisée par l'ADN ligase III. La voie du long patch BER fait intervenir un plus grand nombre de partenaires. Plusieurs nucléotides sont ajoutés au niveau de la lésion par les ADN

polymérase δ , ϵ et β . Ceci provoque un chevauchement (flap), qui est éliminé par l'endonucléase FEN1 (Flap endonuclease). Par la suite, l'ADN est ligué par la ligase I.

PARP1 détecte la SSB, ouvre la chromatine et initie la réparation de la lésion. La détection de la SSB se fait via la liaison du motif ZnF2 de PARP1 à l'extrémité 3' de la paire de base. ZnF2 se dimérise avec le motif ZnF1 d'une seconde molécule de PARP1. La proximité des deux molécules facilite l'accès de la première molécule au domaine catalytique de l'autre. Cette trans-modification entraîne l'activation de PARP1 (Figure 38) (Ali et al., 2012).

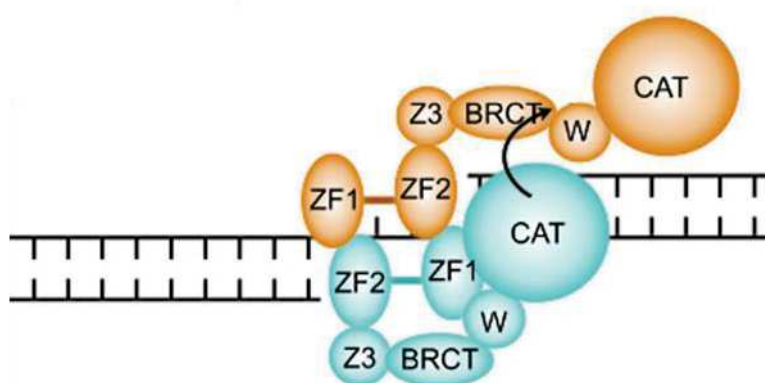


Figure 38 : Modèle de l'activation de PARP1 en réponse aux SSB. PARP1 reconnaît la SSB via le motif ZnF2. ZnF2 se dimérise avec le motif ZnF1 d'une autre molécule PARP1. La proximité des deux molécules permet la trans-activation de PARP1 (D'après Ali et al., 2012).

PARP1 joue le rôle de senseur de la SSB en permettant le recrutement des protéines de réparation suite à son activation après liaison au dommage (Figure 39). PARP1 sous forme parylée PARyle et/ou recrute les protéines du BER par leurs motifs PBM (Cf. partie IIIA2a) pour moduler leur activité et accélérer le processus de réparation (De Vos et al., 2012). Parmi ces facteurs, XRCC1 interagit directement avec PARP1 par leurs domaines BRCT respectifs (El-Khamisy et al., 2003; Masson et al., 1998). XRCC1 est la protéine centrale du BER, puisqu'elle peut interagir avec les différentes protéines du complexe, pour stabiliser et/ou stimuler leur activité (Caldecott, 2003). La PARYlation de PARP1 entraîne le recrutement de XRCC1 au site du dommage induit par différents génotoxiques (UV, H_2O_2 , MMS) (Figure 39) (El-Khamisy et al., 2003; Okano et al., 2003). De plus, l'ADN polymérase β interagit également avec le domaine BRCT de PARP1 (Dantzer et al., 2000). Par ailleurs, XRCC1, la ligase III et PNKP sont PARYlées par PARP1, ce qui stimule leur recrutement (Gagne et al., 2008; Jungmichel et al., 2013; Pleschke et al., 2000).

De plus, PARP1 est spécifiquement impliquée dans la voie du long patch BER en stimulant l'activité de FEN1 (Prasad et al., 2001).

2- Rôles de PARP1 dans la réparation des lésions simple-brin de l'ADN par GG-NER

Certains agents alkylants ainsi que les rayons UV induisent des lésions étendues au niveau de l'ADN en particulier la formation d'adduits. Ces lésions sont réparées par la voie de réparation GG-NER. PARP1 intervient dans l'étape initiale de reconnaissance de la lésion (Figure 39). Les lésions induites par les UV sont reconnues par le complexe XPC / RAD23B et les protéines DDB1 et 2 (DNA damage binding protein) (Marteijn et al., 2014). PARP1 et DDB2 interagissent directement au niveau de la lésion, ce qui a pour conséquence l'activation de PARP1 (Robu et al., 2013). La PARylation de DDB2 augmente la stabilité de la protéine et sa liaison à la chromatine (Figure 39). La PARylation des histones par PARP1 dépendante de DDB2 permet le recrutement au site de la lésion de la protéine de remodelage de la chromatine ALC1 (Amplified in Liver Cancer 1) par son domaine macro (Figure 39) (Pines et al., 2012). ALC1 entraîne la décondensation de la chromatine, ce qui stimule le recrutement du complexe XPC/RAD23B par le domaine de liaison au PAR de XPC (Pines et al., 2012). Avant excision du dommage par les endonucléases, ERCC1 et XPG, la présence de la lésion est reconnue par XPA. Le recrutement de XPA à la chromatine dépend de son association avec PARP1 et PAR à travers son domaine de liaison au PAR (Figure 39) (King et al., 2012).

3- Rôles de PARP1 dans la réparation des Top1cc irréversibles

PARP1 est également impliquée dans la réparation des complexes Top1cc, principalement ceux bloquant la transcription (Figure 39) (Cf partie IID4b) (Cristini et al., 2016; El-Khamisy et al., 2005; Miao et al., 2006). Les Top1cc sont retirés après excision de la liaison 3'phosphate avec l'ADN par TDP1. PARP1 interagit directement avec TDP1 et la PARyle. La PARylation de TDP1 par PARP1 stabilise la protéine TDP1 et augmente son recrutement au niveau du Top1cc sans altérer son activité (Figure 39) (Das et al., 2014). Après excision de la Top1 par TDP1, la SSB est réparée par les protéines du BER, après recrutement de XRCC1, de PNKP et de la ligase III (Figure 39) (Das et al., 2014; Pommier et al., 2014).

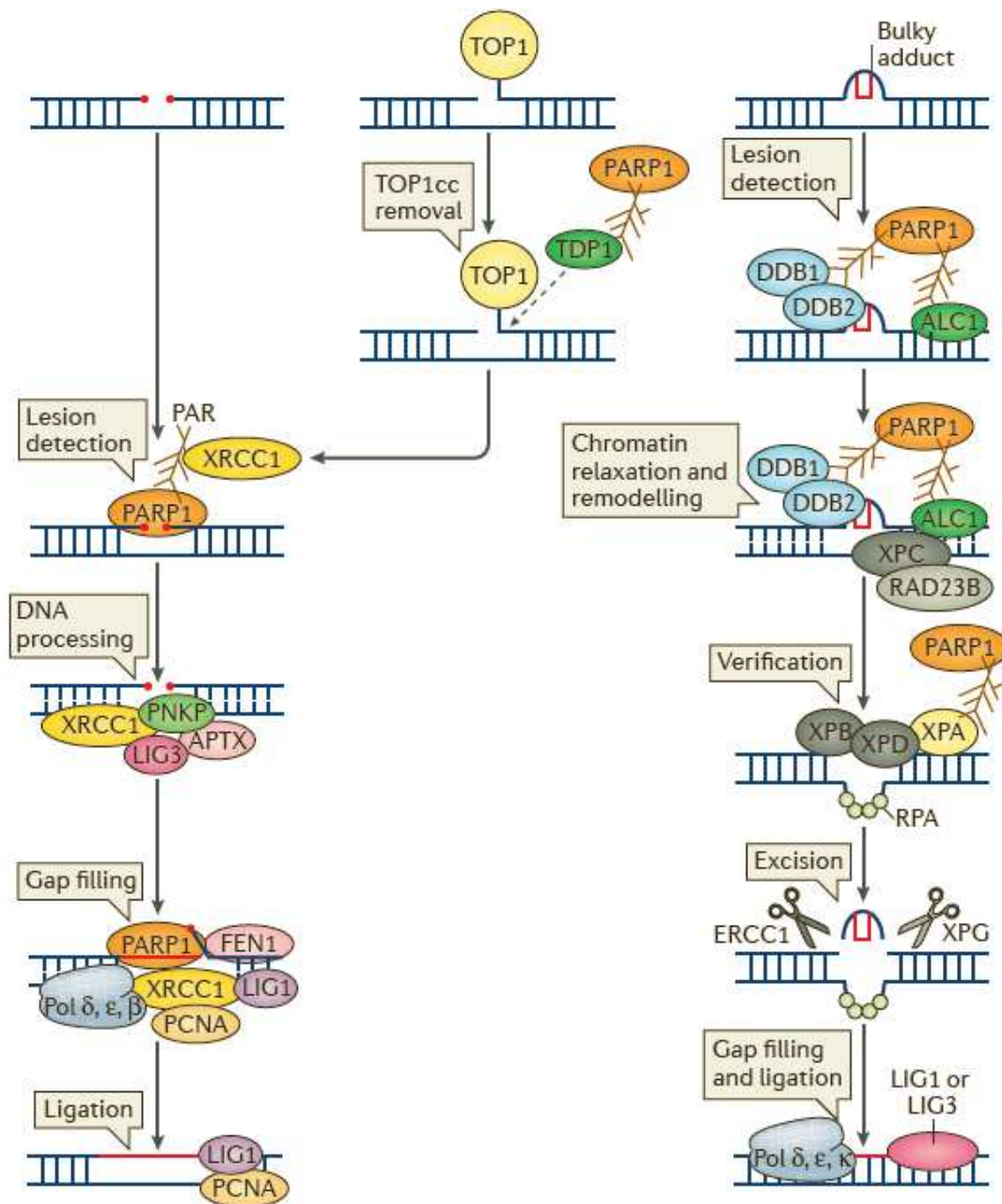


Figure 39 : Rôles de PARP1 dans la réparation des lésions simple-brin de l'ADN. (A) PARP1 joue le rôle de senseur de la SSB et induit le recrutement de XRCC1. XRCC1 recrute les protéines ligase III (LIG3), PNKP et aprataxine (APTX). Les nucléotides sont ajoutés par les ADN polymérases δ , ϵ et β . Le chevauchement est éliminé par FEN1 après stimulation par PARP1. L'ADN est reliqué par la LIG3 ou la ligase I (LIG1). (B) PARP1 participe à la réparation des TOP1cc stabilisés. PARP1 recrute et active TDP1 qui enlève Top1 de l'ADN. La SSB résultante est réparée par le système BER. (C) PARP1 est impliquée dans la réparation des adduits étendus de l'ADN par la voie NER. La lésion est détectée par le complexe DDB1/DDB2, ce qui entraîne l'activation de PARP1. Les parylations de PARP1, DDB2 et des histones induisent la liaison d'ALC1 à la chromatine. La chromatine est alors décondensée, ce qui entraîne le recrutement de XPC et RAD23B. La double hélice est maintenue en position ouverte par XPB et XPD. La vérification de la présence de la lésion par XPA est médiée par PARP1. La lésion est excisée par les endonucléases ERCC1 et XPG. L'ADN est restauré par les polymérases δ , ϵ et β et reliqué par la ligase I ou la ligase III (D'après Ray Chaudhuri and Nussenzweig, 2017).

III.2.1.2 Rôles de PARP1 dans la réparation des DSB

Les DSB sont parmi les dommages les plus délétères pour la cellule puisqu'elles peuvent engendrer des mutations ou des aberrations chromosomiques et ainsi favoriser le processus tumoral. Des DSB exogènes peuvent être générées par les radiations ionisantes ou des agents chimiques tels que la bléomycine et les inhibiteurs de Top1 (Figure 37). Des DSB endogènes peuvent être générées lors d'un stress répliatif, de réarrangements programmés du génome ou par l'action d'enzymes tels que la Top2 (Figure 37) (Mehta and Haber, 2014).

La cellule dispose de trois mécanismes principaux de réparation des DSB : La recombinaison homologue (HR) ainsi que la recombinaison non homologue soit par la voie classique (c-NHEJ), soit par la voie alternative (a-NHEJ) (Chapman et al., 2012; Frit et al., 2014). PARP1 intervient dans chacun de ces systèmes (Figure 41).

PARP1 joue le rôle de senseur des DSB en se liant au niveau de l'ADN via les domaines Zn1, Zn3 et WGR. Ceci induit un changement conformationnel du sous-domaine régulateur du domaine catalytique HD de PARP1. Ce réarrangement permet le repositionnement du domaine BRCT vers le domaine catalytique actif et ainsi l'activation du domaine ART de l'enzyme (Figure 40) (Gagne et al., 2012; Langelier et al., 2012). La PARylation entraîne le recrutement de facteurs impliqués dans la réparation des DSB (Figure 41). Les DSB générées par micro-irradiation laser ou par la méganucléase I-SceI entraînent rapidement le recrutement de PARP1 au niveau du site de lésion ($t_{1/2}$ d'accumulation de PARP1 = 1.5 s). PARP1 est co-localisée avec les marqueurs de DSB, γ -H2AX, ATM et 53BP1 (Haince et al., 2008).

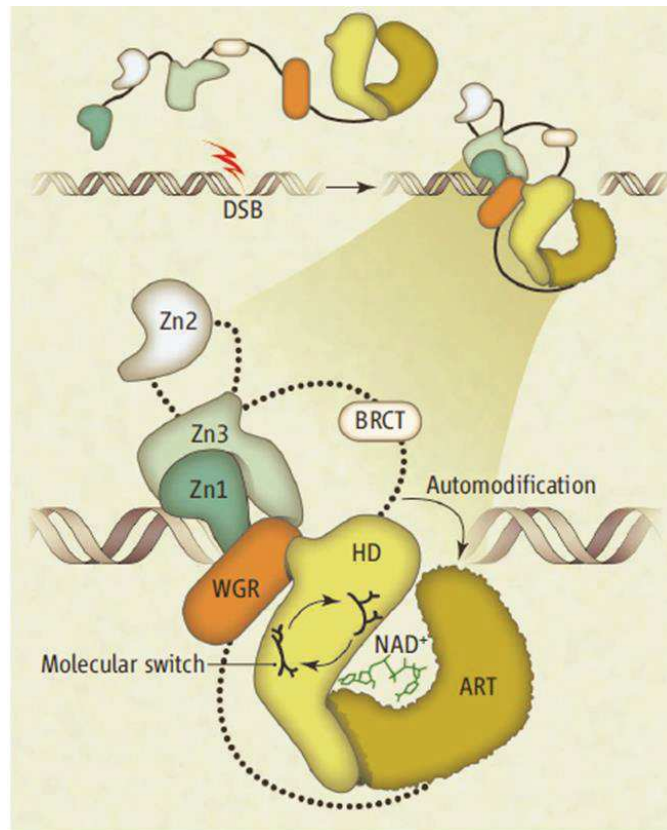


Figure 40 : Modèle de l'activation de PARP1 en réponse aux DSB. Après survenue d'une DSB, PARP1 lie l'ADN clivé via les domaines Zn1, Zn3 et WGR. Ce réarrangement entraîne l'activation du domaine HD (molecular switch), qui va altérer la conformation du domaine catalytique. Ceci permet le rapprochement du domaine BRCT près du site actif et l'autoPARylation de PARP1 (Automodification) (D'après Gagne et al., 2012).

1- Rôles de PARP1 dans la recombinaison homologue

PARP1 n'est pas requise pour le processus de recombinaison lui-même, mais est importante, en amont, dans le recrutement de protéines du complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), impliquées dans la résection de l'extrémité de la DSB (Figure 41). Mre11 et Nbs1 sont recrutées par PARP1 au site de la lésion. La séquence de Mre11 contient un motif PBM permettant sa liaison aux PAR (Haince et al., 2008).

La PARylation de PARP1 stimule le recrutement de BRCA1 en interagissant avec la protéine associée à BRCA1, BARD1 (BRCA1-associated ring domain protein) par son domaine de liaison au PAR (Figure 41) (Li and Yu, 2013). Par la suite, PARP1 contrôle le processus de HR en PARylant BRCA1. En effet, l'inhibition de la forme PARylée de BRCA1 entraîne l'augmentation de la recombinaison induite par les radiations ionisantes. La protéine RAP80 (receptor-associated protein 80) lie la forme PARylée de BRCA1 par son domaine de

liaison au PAR et stabilise ainsi le complexe PARP1-BRCA1-RAP80, ce qui limite la résection de l'extrémité de la cassure (Figure 41) (Hu et al., 2014).

2- Rôles de PARP1 dans la c-NHEJ

PARP1 stimule l'activité enzymatique de DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) et permet ainsi la réparation des DSB (Figure 41). La PARylation de DNA-PK est indépendante du complexe Ku70-Ku80 (Ruscetti et al., 1998). PARP1 entraîne la translocation du facteur de transcription NR4A au site de la cassure (Malewicz et al., 2011). Il en résulte la phosphorylation de DNA-PK et la réparation de la cassure. Récemment, il a été montré que PARP1 recrute la protéine de remodelage de la chromatine CHD2 (chromodomain helicase DNA-binding protein 2), par son domaine de liaison au PAR, au site de la lésion (Figure 41) (Luijsterburg et al., 2016). CHD2 active la c-NHEJ en induisant le recrutement du complexe Ku et de XRCC4 (Luijsterburg et al., 2016).

3- Rôles de PARP dans l'a-NHEJ

La présence de PARP1 est nécessaire au mécanisme d'a-NHEJ (Mansour et al., 2010). L'absence de Ku induit l'activation de la réparation par a-NHEJ, notamment en permettant le recrutement de PARP1 et du complexe MRN au site de la cassure (Cheng et al., 2011). En cas d'absence de c-NHEJ, PARP1 initie le recrutement de Mre11 au site de la cassure pour initier la résection de l'extrémité de la DSB (Figure 41). Dans les cellules déficientes en Ku, l'inhibition de PARP1 entraîne l'incapacité des cellules à réparer les cassures (Mansour et al., 2010).

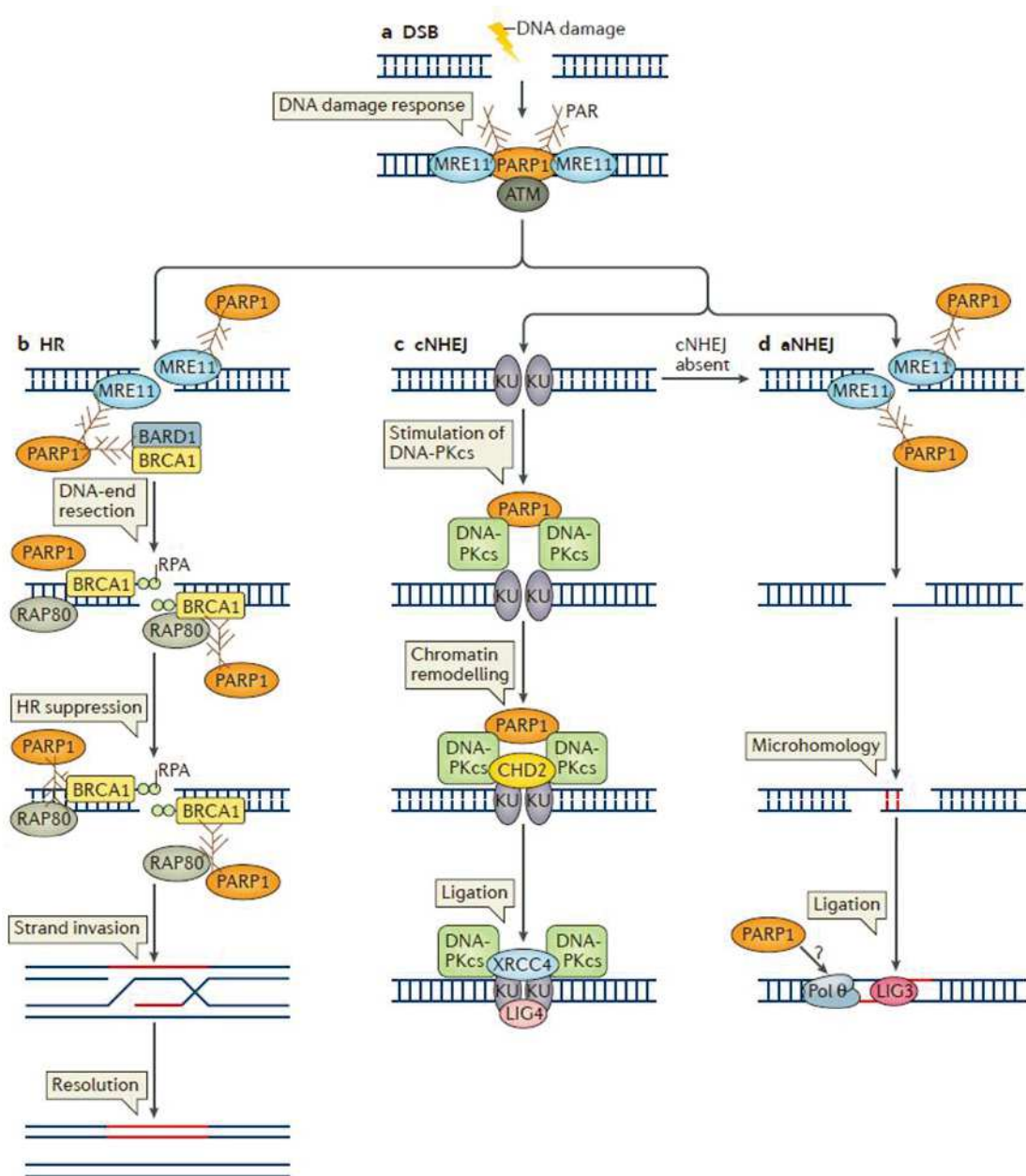


Figure 41 : Rôles de PARP1 dans la réparation des DSB. (A) PARP1 joue le rôle de senseur de la lésion et active la réponse au dommage à l'ADN par son interaction avec Mre11 et ATM. (B) PARP1 est impliquée dans la résection de l'extrémité de la coupure par recombinaison homologue (HR) en recrutant Mre11, suivi de la protéine RPA (replication protein A) qui se lie à l'extrémité simple brin de la coupure. PARP1 stimule le recrutement de BRCA1 via sa liaison avec BARD1. La PARylation de BRCA1 stabilise le complexe avec RAP80 et permet le contrôle de la recombinaison. La synthèse de l'ADN lésé est obtenue en recopiant la séquence homologue sur la chromatide sœur. L'invasion de brin permet d'obtenir la nouvelle synthèse d'ADN en utilisant le chromosome intact comme brin matrice. (C) PARP1 est impliquée dans la réparation par recombinaison non homologue classique (c-NHEJ). Les extrémités de la cassure sont reconnues par le complexe Ku70-Ku80 qui active DNA-PK. DNA-PK peut être également activée par PARP1 dans un mécanisme indépendant de Ku. PARP1 est aussi impliquée dans le remodelage de la chromatine durant le c-NHEJ en recrutant CHD2, qui à son tour facilite le recrutement de XRCC4 qui participe à la religation de l'ADN avec la ligase IV (LIG4). (D) PARP1 est essentiel au déroulement de la recombinaison non homologue alternative (a-NHEJ), en cas d'absence de c-NHEJ. PARP1 induit le recrutement de Mre11 au site de la cassure. Les extrémités de la cassure sont jointes par des séquences de microhomologie, l'ADN polymérase θ synthétise le brin, et la religation est assurée par la ligase III (LIG3) (D'après Ray Chaudhuri and Nussenzweig, 2017).

III.2.2. Rôles de PARP1 dans le remodelage de la chromatine

Le remodelage de la chromatine correspond à la modification de l'architecture de la chromatine et régule les processus de transcription, de réplication et de réparation. PARP1 modifie la structure de la chromatine, soit par une action directe en interagissant avec le nucléosome et/ou en PARylant des histones, soit par une action indirecte en facilitant le recrutement de protéines de remodelage de la chromatine.

III.2.2.1 Action directe de PARP1 sur la chromatine

Sous sa forme non PARylée, la liaison de PARP1 aux nucléosomes participe à la compaction de la chromatine, transcriptionnellement inactive (Ji and Tulin, 2010; Wacker et al., 2007). Au niveau des régions hétérochromatiques, tels que les télomères et les centromères, PARP1 non activée permet de maintenir l'ADN sous un état répressif (Gomez et al., 2006; Kanai et al., 2003). La liaison de PARP1 avec les nucléosomes peut induire l'autoPARylation de PARP1 (Kim et al., 2004). L'autoPARylation de PARP1 inhibe sa liaison aux nucléosomes, facilite la décondensation de la chromatine et la transcription par l'ARN pol II (Figure 42) (Kim et al., 2004; Wacker et al., 2007).

PARP1 a la capacité d'induire la relaxation de la chromatine en PARylant les core histones (Figure 42) (Adamietz and Rudolph, 1984; D'Amours et al., 1999; Kraus and Lis, 2003; Krupitza and Cerutti, 1989; Messner et al., 2010). La PARylation des core histones par PARP1 inhibe la stabilité des nucléosomes et augmente l'accessibilité à la chromatine (Martinez-Zamudio and Ha, 2012). PARP1 participe également au remodelage de la chromatine en entrant en compétition avec l'histone linker H1 vis-à-vis de la liaison à la chromatine au niveau du promoteur et des régions intergéniques de l'ADN (Kim et al., 2004; Krishnakumar et al., 2008). Le déplacement de H1 de la chromatine par PARP1 est indépendante de l'activité de PARylation de PARP1 (Krishnakumar and Kraus, 2010). Le déplacement de H1 de la chromatine médié par PARP1 est corrélée à une chromatine « ouverte » (Figure 42) (Krishnakumar and Kraus, 2010).

III.2.2.2 Action indirecte de PARP1 sur la chromatine

PARP1 peut modifier la chromatine en facilitant le recrutement de protéines de remodelage de la chromatine qui vont augmenter l'accessibilité des protéines de réparation au

site de la lésion. Par exemple, comme décrit dans la section précédente, les protéines ALC1 et CHD2 sont recrutées au site du dommage par leurs domaines de liaison au PAR respectifs (Ahel et al., 2009; Gottschalk et al., 2009; Luijsterburg et al., 2016). En réponse à un dommage, PARP1 recrute également SMARCA5 (SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependent Regulator of Chromatin, subfamily A, member 5), la sous-unité catalytique du complexe de remodelage de la chromatine ISWI, au site de la cassure (Smeenk et al., 2013). SMARCA5 forme un complexe avec la protéine ubiquitine-ligase, RNF168 sous forme PARylée, ce qui permet le recrutement de BRCA1 à la cassure.

Par ailleurs, PARP1 peut modifier la chromatine via la méthylation des histones. PARP1 PARyle l'enzyme KDM4D (lysine K-specific Demethylase 4D) (Khoury-Haddad et al., 2014) et inhibe la déméthylation de la marque des promoteurs actifs H3K4me3 (histone 3 Lysine 4 triméthylée) en PARylant l'enzyme KDM5B (lysine K-specific Demethylase 5B) (Krishnakumar and Kraus, 2010). PARP1 sous forme parylée est également capable de modifier la composition des nucléosomes en recrutant le variant d'histone macroH2A1.1 (Timinszky et al., 2009).

D'autre part, PARP1 est capable de réguler la méthylation de l'ADN en inhibant l'activité de l'enzyme DNMT1 (DNA MethylTransferase 1) via la PARylation (Reale et al., 2005).

III.2.3. Rôles de PARP1 dans la transcription

PARP1 est impliquée dans la régulation des ARNm mais également dans celles des ARNr. En effet, elle intervient dans le maintien de l'hétérochromatine de l'ADNr et module la maturation des ARNr et l'assemblage du ribosome (Boamah et al., 2012; Dantzer and Santoro, 2013; Guetg et al., 2012). Dans ce manuscrit, je développerai uniquement le rôle de PARP1 dans la régulation transcriptionnelle des ARNm.

III.2.3.1 En l'absence de dommages de l'ADN

PARP1 est impliquée dans la régulation de la transcription de nombreux gènes. Deux études se sont intéressées à l'effet de l'inhibition de PARP1 sur l'expression des gènes par analyse microarray sur le génome entier (Frizzell et al., 2009; Ogino et al., 2007). La première étude a montré que la déficience de PARP1 dans les cellules souches embryonnaires et de foie

murines altèrent l'expression de 9,6% et 3,3 % des gènes respectivement (facteur de 2-fold minimum) (Ogino et al., 2007). La proportion de gènes inhibés est plus importante dans les deux modèles (2/3 de gènes inhibés contre 1/3 de gènes surexprimés). Les gènes dont l'expression est régulée par PARP1, dépendent du type cellulaire et sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que la transcription, le contrôle du cycle cellulaire, le métabolisme et la transduction de signaux cellulaires. La seconde analyse a révélé que l'inhibition de PARP1 par shRNA dans les cellules tumorales mammaires MCF-7 modifie l'expression de 8,7% des gènes (Frizzell et al., 2009). Parmi la liste des gènes pour lesquels la régulation de l'expression est la plus importante, la moitié sont surexprimés, alors que l'autre moitié sont inhibés. Les gènes dont l'expression est grandement altérée sont impliqués dans le métabolisme, la régulation de la structure cellulaire et la réponse au stress.

Plusieurs mécanismes impliqués dans la régulation de la transcription des gènes par PARP1 ont été décrits. L'effet de PARP1 sur la modulation de l'expression génique peut être dépendant ou indépendant de son activité catalytique en fonction du gène concerné (Frizzell et al., 2009). Krishnakumar et al., ont déterminé la localisation de PARP1 dans les différentes régions du génome par la méthode ChIP-chip (Krishnakumar et al., 2008). PARP1 est enrichie dans les régions situées à proximité du site d'initiation de la transcription et est associée aux gènes transcriptionnellement actifs. Plus récemment, Gibson et al. ont rapporté un enrichissement de la PARylation médiée par PARP1 au niveau des promoteurs des gènes transcriptionnellement actifs, caractérisé par la présence élevée de la marque H3K4me3 (Gibson et al., 2016). Bien que plus faiblement que dans les régions promotrices, la PARylation médiée par PARP1 est augmentée dans le corps des gènes actifs et dans les régions enhancers par rapport aux régions contrôles. A l'inverse, PARP1 non PARylée est fortement associée à la chromatine à l'état répressif (Gibson et al., 2016).

PARP1 peut modifier l'expression des gènes en modulant la structure et la composition de la chromatine. La PARylation des core histones par PARP1 augmente l'accessibilité à la chromatine et favorise la transcription (Figure 42) (Martinez-Zamudio and Ha, 2012). PARP1 exclue l'histone H1 du promoteur et permet de maintenir la chromatine sous forme ouverte (Figure 42) (Krishnakumar and Kraus, 2010). La liaison de PARP1 au promoteur est corrélée positivement à l'expression génique tandis que celle de H1 est corrélée négativement (Krishnakumar et al., 2008). Dans les gènes transcriptionnellement actifs, la déplétion de

PARP1 rétablit la liaison de l'histone H1 au promoteur et inhibe la transcription (Krishnakumar et al., 2008).

PARP1 régule l'expression génique par des mécanismes épigénétiques. L'enzyme facilite le recrutement de la machinerie transcriptionnelle à la chromatine en maintenant un niveau élevé de la marque H3K4me3 au niveau du promoteur des gènes positivement régulés via la PARylation de KDM5B par PARP1 (Figure 42) (Krishnakumar and Kraus, 2010). De plus, il se pourrait que PARP1 augmente l'expression génique en inhibant la méthylation de l'ADN via la PARylation de l'enzyme DNMT1 (Figure 42) (Reale et al., 2005).

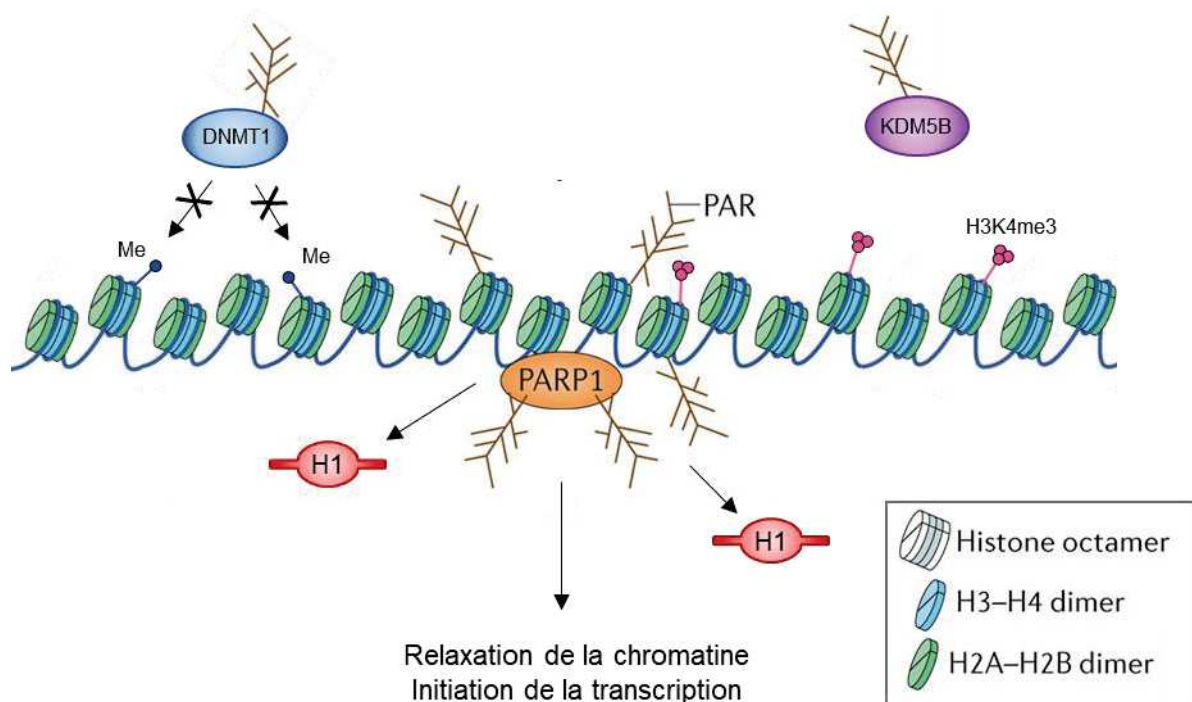


Figure 42 : Rôles de PARP1 dans la régulation de la chromatine et l'augmentation de l'initiation de la transcription. PARP1 exclue l'histone linker H1 du promoteur et PARyle les core histones. PARP1 maintient un niveau élevé d'histones H3K4me3 en PARylant KDM5B. La PARylation de DNMT1 par PARP1 pourrait inhiber la méthylation de l'ADN. Ces différents mécanismes augmentent la relaxation de la chromatine et facilitent l'initiation de la transcription (Adapté de Ray Chaudhuri and Nussenzweig, 2017).

D'autre part, PARP peut moduler la transcription de gènes en régulant directement des facteurs de transcription ou des corégulateurs de la transcription. Par exemple, après traitement des cellules au lipopolysaccharide (LPS), PARP1 lie et PARyle la sous-unité p65 de la protéine NF- κ B, stimulant ainsi son activité transcriptionnelle et l'augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires (Hassa et al., 2008; Liu et al., 2012).

PARP1 participe à la régulation de l'élongation des ARNm en PARylant les sous-unités du facteur inhibiteur de l'élongation de la transcription (NELF : negative elongation factor), NELF-A et NELF-E (Figure 43) (Gibson et al., 2016). Le facteur NELF est impliqué dans l'étape de pause de l'ARN polymérase II, permettant d'assurer une élongation productive. L'ARN polymérase II se met en pause après synthèse d'un ARN naissant de 20 à 60 nucléotides (Figure 43A). La libération de l'ARN polymérase II du site de pause est médiée via le recrutement du complexe positif de l'élongation de la transcription (P-TEFb) et à la dissociation concomitante de NELF (Liu et al., 2015). La PARylation de NELF-E par PARP1 inhibe sa liaison à l'ARN et entraîne ainsi la libération de l'ARN polymérase II du site de pause (Figure 43B et C) (Gibson et al., 2016). L'inhibition de PARP1 par shRNA ou avec l'inhibiteur de PARP PJ34 augmente le taux d'ARN pol II en pause et diminue le taux d'ARN pol II dans le corps du gène. Ce résultat suggère que la PARylation par PARP1 est nécessaire à la libération de l'ARN pol II. Par ailleurs, la PARylation de NELF-E par PARP1 est dépendante de la phosphorylation de NELF par la kinase CDK9 (Cyclin-dependent kinase 9) du complexe P-TEFb (Figure 43B) (Gibson et al., 2016). Au niveau du promoteur, la présence de la PARylation médiée par PARP1 et de CDK9 est corrélée à de faibles taux d'ARN polymérase en pause (Gibson et al., 2016). Ainsi, il semblerait que la PARylation de NELF-E par PARP1 renforce l'effet de P-TEFb sur la libération de l'ARN pol II du site de pause vers une élongation productive pour un sous-ensemble de gènes régulés par NELF-E.

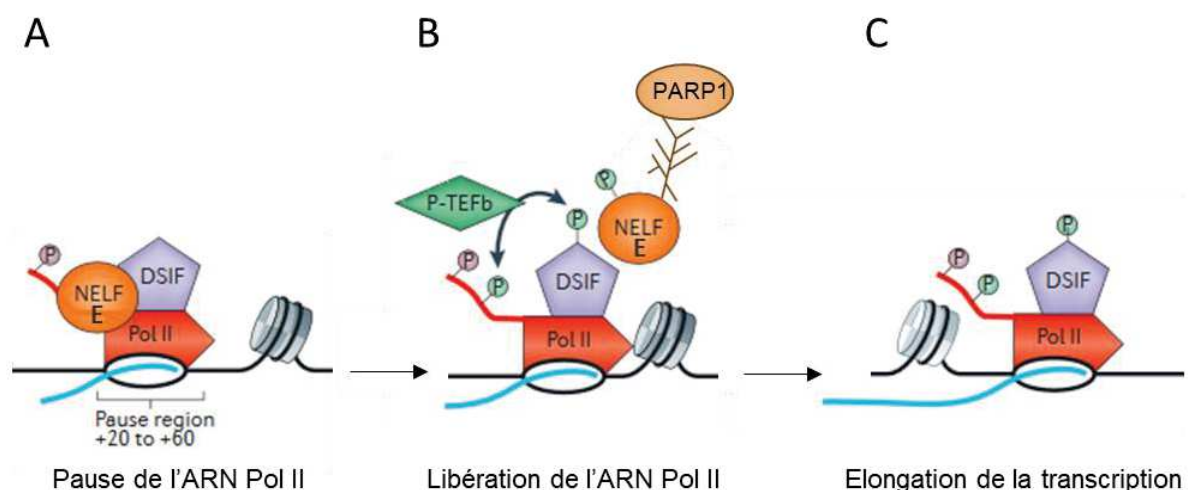


Figure 43 : Rôle de PARP1 dans la régulation de l'élongation de la transcription de gènes. (A) L'ARN pol II (Pol II) se met en pause après synthèse d'un ARN naissant de 20 à 60 nucléotides. L'ARN pol II est maintenu en pause par les facteurs NELF-E et DSIF (DRB sensitivity-inducing factor). (B) Le complexe P-TEFb phosphoryle l'ARN pol II, NELF-E et DSIF. NELF-E sous forme phosphorylé est PARylée par PARP1 et se dissocie de l'ARN pol II. L'ARN pol II est alors libéré du site de pause. (C) L'ARN pol II entre en élongation productive (Adapté Adelman and Lis, 2012).

III.2.3.2 Au niveau du dommage de l'ADN

Suite à un dommage de l'ADN, PARP1 peut être impliquée dans la répression transcriptionnelle des gènes (Awwad et al., 2017; Chou et al., 2010). Cette répression semble être associée au rôle de PARP1 dans la réparation de l'ADN de gènes hautement transcrits afin de prévenir l'interférence entre la machinerie transcriptionnelle et le processus de réparation de l'ADN. Parmi les mécanismes décrits, l'activation de PARP1 suite à une DSB inhibe la transcription des gènes en recrutant les complexes répressifs modifiant la chromatine NuRD (nucleosome remodeling and deacetylase) et PcG (Polycomb Group) au site du dommage (Chou et al., 2010). Récemment, il a été montré qu'en réponse à une DSB, PARP1 inhiberait la transcription en recrutant NELF-E au niveau des sites de la cassure dans des gènes hautement transcrits (Awwad et al., 2017). Lorsque NELF-E est associée à la DSB, elle se trouve sous une forme peu PARylée et est donc active. Ainsi, NELF-E prolonge la pause de l'ARN pol II et permet la réparation de la DSB (Awwad et al., 2017).

Toutefois, il se pourrait qu'en réponse à un dommage, PARP1 participe à l'activation transcriptionnelle de gènes induits par les dommages, tels que GADD34. Récemment, il a été montré qu'en condition normale, PARP1 pouvait être associée à PARP13 et HSF1 dans un complexe tertiaire notamment au niveau du promoteur des gènes. Ce complexe est maintenu par HDAC1 (Histone deacetylase 1) qui inactive PARP1 par déacétylation. Après survenue d'une DSB, la levée de l'inhibition par HDAC1 et la PARylation de PARP1 entraînent sa dissociation du complexe PARP13-HSF1. En conséquence, PARP1 est redistribuée du promoteur vers le corps du gène GADD34, PARyle la chromatine et augmente l'expression de GADD34 (Fujimoto et al., 2017).

III.2.4. Rôles de PARP1 dans la stabilisation de l'ARNm

Récemment, il a été mis en évidence que PARP1 régule l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel via les protéines de liaison à l'ARN (RBP : RNA binding proteins) (Ke et al., 2017). Des séquences riches en AU appelées AREs (AU Rich Elements) favorisant l'instabilité de l'ARNm sont présentes au niveau de la région 3'UTR de certains ARNm. Afin d'augmenter la stabilité des ARNm contenant des séquences AREs, des protéines de liaisons aux AREs (ARE-BP : ARE binding proteins) sont recrutées sur l'ARNm (Chen and Shyu, 1995). Parmi la famille des ARE-BP, la protéine HuR stabilise certains

ARNm et favorise leur traduction (Fan and Steitz, 1998). PARP1 interagit et PARyle HuR après traitement des cellules au LPS (Ke et al., 2017). La PARylation de HuR favorise sa liaison aux régions AREs des ARNm cibles et par conséquent augmente leur stabilité (Ke et al., 2017).

III.2.5. Rôles de PARP1 dans la réplication

PARP1 est impliquée dans la stabilisation des fourches de réplication en contrôlant la régression des fourches, en réponse au stress réplcatif (Ray Chaudhuri et al., 2012; Zellweger et al., 2015). Différents agents altérant le processus de réplication de l'ADN entraînent le ralentissement et la régression des fourches de réplication pour permettre la réparation des lésions et limiter l'instabilité génomique. L'activation de PARP1 participe au maintien de la régression des fourches de réplication induite par la CPT (Ray Chaudhuri et al., 2012; Sugimura et al., 2008; Zellweger et al., 2015), l'agent alkylant la mitomycine C et l'hydroxyurée (Zellweger et al., 2015). L'inactivation de PARP1 abolit ces effets et par conséquent augmente la formation de DSB (Ray Chaudhuri et al., 2012). Après régression, le redémarrage de la fourche est restauré par l'hélicase RECQ1. La liaison de RECQ1 avec PARP1 sous forme parylée inhibe son action sur la restauration de l'activité de la fourche et permet la réparation de la lésion (Berti et al., 2013). En condition de stress réplcatif, l'inhibition de PARP1 entraîne le redémarrage des fourches après la levée de la répression de l'activité de RECQ1. L'hyperactivité de l'hélicase mène à un redémarrage prématuré qui a pour conséquence la formation de DSB par le système de « replication run-off » décrit dans le chapitre II.

D'autre part, PARP1 régule le redémarrage de la fourche de réplication par un autre mécanisme dépendant de la protéine du complexe MRN, MRE11 (Bryant et al., 2009). Le blocage des fourche de réplication induit par un stress réplcatif tel que l'hydroxyurée entraîne l'activation de PARP1. Cette activation permet de recruter MRE11 qui induit la résection de la fourche (Bryant et al., 2009). Cependant, PARP1 limite la résection excessive des fourches par MRE11 notamment quand le gène BRCA2 est absent (Ying et al., 2012). En effet, BRCA2 contrôle l'accès de MRE11 à la fourche. En cas d'absence de BRCA2, l'accès de la protéine n'est plus limité. Une augmentation de l'activité de PARP1 a été observée dans les cellules déficientes en BRCA2. L'inhibition de PARP1 dans ces cellules induit la formation

de DSB conséquent à la résection excessive des fourches de réplication par MRE11 dont la présence n'est plus contrôlée par PARP1 et BRCA2 (Ying et al., 2012).

III.3. Inhibiteurs de PARP

De par son implication dans la réparation de l'ADN, PARP1 est considérée comme une cible pharmacologique intéressante dans les cancers. De plus, l'expression de PARP1 est augmentée dans de nombreux types de tumeurs et la PARylation est augmentée dans l'hépatocarcinome (Hirai et al., 1983; Nomura et al., 2000; Ossovskaya et al., 2010).

La majorité des inhibiteurs de PARP commercialisés ne sont pas sélectifs de PARP1 mais inhibent également PARP2 et PARP3 (Wahlberg et al., 2012).

La première génération d'inhibiteur de PARP, les analogues du nicotinamide, a été développée après observation que le nicotinamide formé lors de la PARylation, inhibait l'activité de PARP en entrant en compétition avec le NAD^+ en tant que substrat de PARP (Clark et al., 1971). La substitution de l'atome d'azote en position trois du cycle du nicotinamide par un atome de carbone a permis l'obtention de la classe des benzamides (Figure 44). Les benzamides sont de plus puissants inhibiteurs de PARP (Purnell and Whish, 1980). En effet, le 3-aminobenzamide (3-AB) inhibe de 96% la PARylation contre 63% pour le nicotinamide. Cependant, l'utilisation de ces analogues en clinique n'est pas adaptée car ils nécessitent des concentrations de l'ordre du millimolaire pour être efficace et ne sont pas des inhibiteurs spécifiques de PARP puisqu'ils inhibent également la synthèse d'ADN (Milam and Cleaver, 1984).

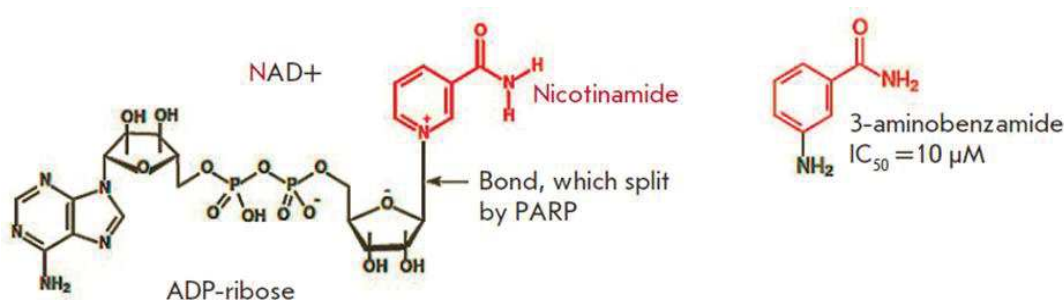


Figure 44 : Structure de l'inhibiteur de première génération de PARP, le 3-aminobenzamide (3-AB). Les inhibiteurs de première génération dérivent du groupement nicotinamide et entrent en compétition avec le NAD^+ en tant que substrat de PARP. Le groupement nicotinamide est représenté en rouge (D'après Malyuchenko et al., 2015).

Dans les années 1990, une deuxième génération d'inhibiteurs de PARP plus efficaces et spécifiques a été développée : les analogues des quinazolines (Figure 45) (Banasik et al., 1992). Cette classe inclut les molécules de la famille des isoquinolines, des quinazolinédiones, des phthalazinones, et des phenanthridinones. La caractérisation de la relation structure/activité de PARP a permis le développement de deux molécules, PD128763 et NU1025, 50 fois plus efficaces que le 3-AB. Ces inhibiteurs possèdent dans leur séquence un groupement carboxamide au niveau du deuxième cycle aromatique leur permettant d'augmenter leur liaison à PARP (Ruf et al., 1998).

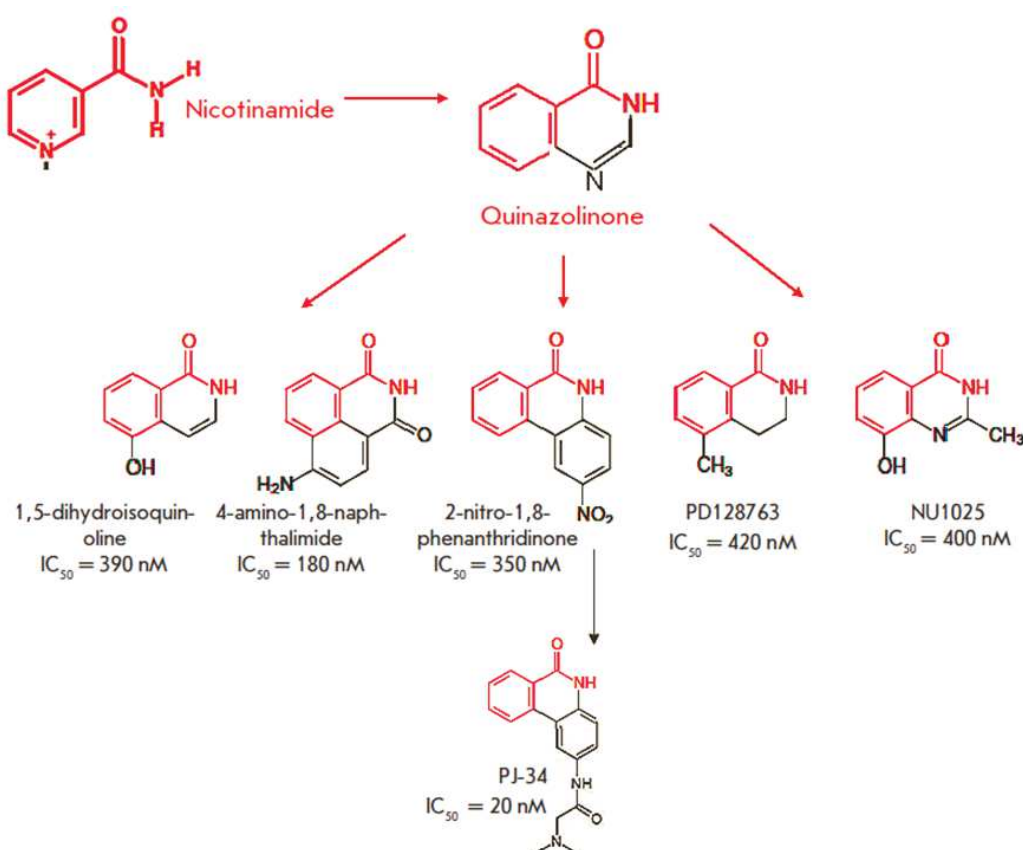


Figure 45 : Structure des inhibiteurs de deuxième génération de PARP, les analogues des quinazolines. Le groupement nicotinamide est représenté en rouge (D'après Malyuchenko et al., 2015).

Les recherches sur la relation structure / activité de PARP1 ont abouti au développement d'une troisième génération d'inhibiteurs de PARP, les analogues des benzimidazoles (Figure 46). Ces inhibiteurs sont encore plus efficaces et spécifiques ($IC_{50} \leq 5 \text{ nM}$) et peuvent être utilisés en cliniques (Donawho et al., 2007; Menear et al., 2008; Thomas et al., 2007). Nombreux d'entre eux sont ou ont été testés en essais cliniques : rucaparib (AG-014699), olaparib (AZD2281), veliparib (ABT-888), niraparib (MK4827), talazoparib (BMN-763) (Sonnenblick et al., 2015).

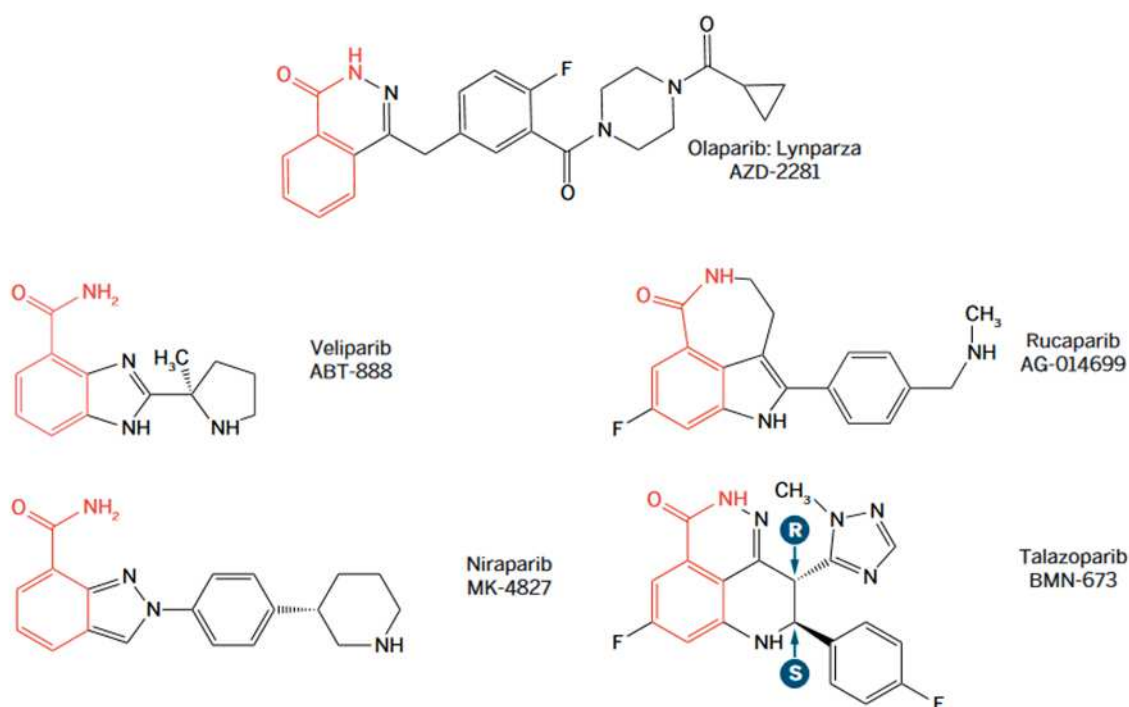


Figure 46 : Structure des inhibiteurs de troisième génération de PARP, les analogues du benzimidazoles. Le groupement nicotinamide est représenté en rouge. Les flèches bleues indiquent les centres racémiques du Talazoparib, expliquant la sélectivité de l'énantiomère actif (D'après Pommier et al., 2016a).

Tous les inhibiteurs de PARP actuellement en essais cliniques sont des inhibiteurs catalytiques (Figure 46). Cependant la cytotoxicité de ces inhibiteurs ne dépend pas uniquement de leur habilité à inhiber la PARylation. En effet, certains inhibiteurs possèdent la capacité de piéger PARP1 et PARP2 sur l'ADN (Murai et al., 2012). Les complexes cytotoxiques PARP-ADN ainsi formés peuvent interférer avec la réplication de l'ADN. Les inhibiteurs de PARP peuvent être classés pour leur habilité à piéger PARP sur l'ADN (du plus puissant au moins puissant) : talazoparib >> niraparib > olaparib = rucaparib >> veliparib (Murai et al., 2012; Murai et al., 2014a; Pommier et al., 2016a).

III.4. Utilisation thérapeutique des inhibiteurs de PARP dans les cancers

Le développement de l'utilisation des inhibiteurs de PARP dans le traitement des cancers est en plein essor. Actuellement, 163 essais cliniques évaluant l'effet de PARP en monothérapie ou en association sont en cours ou en phase de recrutement dans le traitement des tumeurs solides (ClinicalTrials.gov, 2017).

Les premières expériences *in vitro* menées avec différents inhibiteurs de PARP ont montré que ces molécules exerçaient des effets synergiques lorsqu'elles étaient associées à

divers cytotoxiques comme les agents alkylants (témozolomide, cisplatine), les inhibiteurs de Top1 ou les IR (Calabrese et al., 2003; Murai et al., 2014b; Thomas et al., 2007). De plus, les inhibiteurs de PARP peuvent être utilisés en monothérapie puisqu'ils ont la capacité de sensibiliser des modèles mutés ou déficients pour un gène impliqué dans les voies de réparation de l'ADN (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005).

III.4.1. Association à la chimiothérapie et à la radiothérapie

Le développement clinique initial des inhibiteurs de PARP est basé sur la potentialisation de la mort des cellules cancéreuses par les agents ciblant l'ADN tels que les agents alkylants, les inhibiteurs de Top1 et les IR. Les premiers essais cliniques ont consisté à évaluer la tolérance de ces associations et vérifier si la sensibilisation des inhibiteurs de PARP observée au niveau préclinique était retrouvée chez les patients.

L'inhibition de PARP par la molécule AG14361 chimiosensibilise les xénogreffes de tumeurs coliques humaines au traitement par le témolozomide ou l'irinotécan ainsi que les radiosensibilise (Calabrese et al., 2004). Le véliparib potentialise les effets du témolozomide, des platines et des IR dans différents modèles de xénogreffes de tumeurs humaines (Donawho et al., 2007). L'olaparib (AZD2281) montre des effets synergiques en association avec le cisplatine et le carboplatine dans des modèles tumoraux déficients en BRCA1 (Rottenberg et al., 2008).

De nombreux essais cliniques en phase I, II ou III associant les inhibiteurs de PARP aux agents cytotoxiques sont actuellement menés dans le traitement des tumeurs solides (ClinicalTrials.gov, 2017). Par exemple, huit essais cliniques de phase I ou II associant les inhibiteurs de PARP aux analogues de la CPT sont actifs ou en phase de recrutement.

III.4.2. Létalité synthétique

L'utilisation des inhibiteurs de PARP en monothérapie est basée sur le concept de létalité synthétique et a été décrit par Bryant et al. et Farmer et al. en 2005 (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). Le terme de létalité synthétique a été introduit pour la première fois par Dobzhansky en 1946 et repose sur l'idée que la perte de fonction simultanée de deux gènes essentiels induit la mort cellulaire, alors que la déficience d'un seul n'est pas létale (Dobzhansky, 1946). Ainsi, par exemple, les cellules tumorales possédant la mutation

inactivatrice non létale, des gènes BRCA1 ou BRCA2 impliqués dans la réparation des DSB de l'ADN par HR peuvent être tuées après exposition aux inhibiteurs de PARP (Fong et al., 2009; Hay et al., 2009; Rottenberg et al., 2008). L'hypothèse initiale était que les DSB persistantes résultant de l'inhibition de PARP1 seraient convertis en DSB lors de la réplication. Dans les cellules normales non mutées pour le gène BRCA1/2, les DSB seront normalement réparés par HR alors qu'elles ne pourront pas être réparés dans les cellules cancéreuses déficientes en BRCA1/2. Ce défaut de réparation aboutirait à l'augmentation de l'instabilité génomique et à la mort de la cellule tumorale (Ashworth, 2008).

De nombreuses études précliniques et cliniques ont confirmé les effets antitumoraux des inhibiteurs de PARP dans les tumeurs mutées BRCA1/2 (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005; Gelmon et al., 2011; Ledermann et al., 2012; Mirza et al., 2016; Swisher et al., 2017). L'équipe de Bryant et al. a montré que les deux inhibiteurs de PARP NU1025 et AG14361 diminuent la survie des cellules déficientes en BRCA2 (Bryant et al., 2005). En accord avec ces résultats, le laboratoire de Farmer et al a rapporté que l'inhibition de PARP par KU0058684 et KU0058948 sensibilisait les cellules déficientes en BRCA2 mais également celles déficientes en BRCA1 (Farmer et al., 2005). La potentialisation de l'effet de l'inhibition de PARP dans des modèles mutés BRCA1/2 a été validé *in vivo* chez la souris puis chez le patient (Fong et al., 2009; Hay et al., 2009; Rottenberg et al., 2008). Le traitement de modèles murins de cancers du sein déficient en BRCA1 ou BRCA2 par l'olaparib diminue la croissance tumorale et augmente la survie des souris (Hay et al., 2009; Rottenberg et al., 2008). L'effet antitumoral de l'inhibition de PARP dans les cancers mutés BRCA a été affirmé dans un essai clinique de phase I mené chez des patients atteints de différents types de tumeurs solides (ovarien, mammaire, colorectal, mélanome, sarcome, prostate...) mutés BRCA1 ou BRCA2 (Fong et al., 2009).

En 2014, l'olaparib (LYNPARZA®) a bénéficié d'une autorisation de mise sur le marché par l'AEM (Agence Européenne du Médicament). La molécule est indiquée en monothérapie dans le traitement d'entretien des patientes adultes atteintes d'un cancer épithélial séreux de haut grade de l'ovaire, des trompes de Fallope ou péritonéal primitif : (1) récidivant et sensible au platine, (2) avec une mutation du gène BRCA (germinale et/ou somatique) et (3) qui sont en réponse, complète ou partielle, à une chimiothérapie à base de platine (HAS, 2015; VIDAL, 2017). Récemment, deux autres molécules, le rucaparib (RUBRACA®) et le niraparib (ZEJULA®), ont été autorisées aux Etats-Unis par la FDA,

dans le traitement des cancers de l'ovaire mutés BRCA, en monothérapie (FDA, 2016, 2017). De nombreux essais cliniques avec les différents inhibiteurs de PARP dans des cancers mutés BRCA sont en cours (ClinicalTrials.gov, 2017).

La stratégie de létalité synthétique peut être étendue aux cancers déficients pour la voie de réparation en HR par des mécanismes différents de BRCA1/2, phénomène appelé « BRCAness » (Cerrato et al., 2016; del Rivero and Kohn, 2017). Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués : perte de RAD51, mutation d'ATM/ATR, de CHK2 ou du gène Fanconi, amplification de EMSY...

III.4.3. La résistance aux inhibiteurs de PARP

Certains patients ne répondent pas initialement ou développent des résistances secondaires aux inhibiteurs de PARP. Ces résistances peuvent être liées à la restauration de la réparation par HR dans les tumeurs. En effet, il a été rapporté que certains patients deviennent résistants au traitement par l'olaparib après acquisition d'une mutation secondaire de BRCA2 (Barber et al., 2013). De plus, un des mécanismes de résistance rapporté est dû à la perte d'expression de PARP1 (Bajrami et al., 2014; Murai et al., 2012). Un autre mécanisme de résistance est lié au fait que les inhibiteurs de PARP soient des substrats de la protéine d'efflux MDR1/Pgp (Multidrug Resistance Protein 1 / Permeability-GlycoProtein) (Henneman et al., 2015; Lawlor et al., 2014; Parrish et al., 2015).

III.5. *Liens entre PARP1 et Top1*

Comme indiqué précédemment, l'inhibition de PARP sensibilise les cellules à la CPT et ses dérivés (Cf. partie III.4.1). En effet, les cellules déficientes en PARP1 sont hypersensibles à la CPT (Chatterjee et al., 1989; Hochegger et al., 2006; Pommier et al., 2006; Smith et al., 2005). L'inhibition pharmacologique de PARP1 potentialise la cytotoxicité de la CPT et de ses analogues dans différentes lignées tumorales et dans des modèles de xénogreffes de souris notamment en augmentant la formation de DSB (Bowman et al., 2001; Calabrese et al., 2004; Cristini et al., 2016; Delaney et al., 2000; Mattern et al., 1987; Miknyoczki et al., 2003; Patel et al., 2012; Smith et al., 2005; Zhang et al., 2011b). Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cette synergie.

En condition normale, PARP1 et la Top1 interagissent dans la cellule (Bauer et al., 2001; Yung et al., 2004). L'interaction entre les deux permet d'augmenter l'activité de relaxation de la Top1. En réponse à un dommage induit par l'agent alkylant MNNG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine), PARP1 est auto-PARylée et se détache de la Top1. Par conséquence, l'activité de la Top1 diminue (Yung et al., 2004)

Les Top1cc produites par la CPT induisent l'autoPARylation de PARP1 et augmentent le taux de PARylation global dans la cellule (Bowman et al., 2001; Das et al., 2014; Fu et al., 2016; Zhang et al., 2011). Par ailleurs, la CPT induit la PARylation de Top1 (Das et al., 2016). L'augmentation de la PARylation a pour conséquence l'activation de la réparation des Top1cc par les voies dépendante de PARP1 (Das et al., 2014; Ray Chaudhuri et al., 2012). Comme décrit dans le chapitre II.4.3., les Top1cc peuvent être réparées par trois mécanismes différents : la voie des hélicases, la voie TDP1 et la voie des endonucléases. PARP1 intervient dans les deux premiers mécanismes. PARP1 inhibe l'action de l'hélicase RECQ1 afin de bloquer le redémarrage des fourches de réplication jusqu'à ce que la réparation des Top1ccs soit terminée (Berti et al., 2013; Ray Chaudhuri et al., 2012; Sugimura et al., 1971). L'enzyme TDP1 hydrolyse la liaison phosphodiester entre l'extrémité 3' de l'ADN et la Top1. L'inhibition de PARP par l'olaparib ou le véliparib n'augmente pas la réponse cytotoxique de la CPT dans des cellules déficientes en TDP1 (Alagoz et al., 2014; Das et al., 2014; Zhang et al., 2011b). Le domaine N-terminal de TDP1 lie directement le domaine C-terminal de PARP1 (Das et al., 2014). De plus, PARP1 stabilise TDP1 en PARylant l'enzyme. Cette PARylation entraîne le recrutement de TDP1 au site du dommage sans modifier son activité catalytique (Das et al., 2014).

L'inhibition de PARP1 par l'AG14361 augmente le nombre de SSB produites par le topotécan. Cependant, l'AG14361 n'a pas d'effet sur le nombre de Top1cc formés par le topotécan à des temps courts (30 min), ni après un long traitement (16 heures) (Smith et al., 2005). De même, l'inhibition de PARP1 par le véliparib augmente le nombre de DSB produites par la CPT mais ne modifie pas le taux de Top1cc induit par la CPT, notamment dans les cellules U2OS (Zhang et al., 2011b).

OBJECTIFS

Mon laboratoire de thèse s'intéresse au rôle de la protéine RhoB dans la progression tumorale et les mécanismes de résistance aux génotoxiques et aux agents utilisés en thérapie ciblée dans le cancer. Des travaux de l'équipe ont mis en évidence une nouvelle fonction de RhoB dans la réponse aux dommages induits par la CPT (Mamouni et al., 2014). En réponse à la CPT, l'activation de la voie Chk2-HuR-RhoB favorise la déphosphorylation de γ H2AX par la phosphatase PP2A et la réparation des DSB. Il a été montré, dans la littérature (Cf. Partie I.1.4.2.) que d'autres GTPases Rho, comme Rac1, participent à la réponse aux dommages de l'ADN. L'ensemble de ces données nous amène à déterminer s'il existe d'autres GTPases Rho impliquées dans la réponse aux traitements génotoxiques.

Dans ce contexte, le premier objectif de ma thèse était de déterminer parmi toutes les GTPases Rho, lesquelles étaient induites de façon précoce par la CPT. Le choix de la CPT repose sur deux critères : la sélectivité de la molécule et le fait qu'elle produise des DSB (Pommier, 2006). En effet, la CPT a pour unique cible la Top1. Son mécanisme d'action consiste à stabiliser la formation de complexes de clivage Top1-ADN appelés « Top1cc ». La stabilisation des Top1cc génère la formation de DSB. Les DSB sont parmi les dommages les plus délétères pour la cellule. Si elles ne sont pas réparées, elles peuvent aboutir à la mort de la cellule ou engendrer des mutations ou des aberrations chromosomiques et ainsi favoriser le processus tumoral. Pour cette étude, nous avons choisi comme modèle principal les cellules d'ostéosarcome U2OS, fréquemment utilisées dans l'étude des dommages de l'ADN car elles sont proficientes pour les voies de signalisation des dommages de l'ADN. Lors de ce crible, outre RhoB, nous avons identifié deux nouvelles Rho GTPases induites par la CPT : RhoV et RND1. En réponse à la CPT, le taux d'induction le plus fort est celui de RND1. De plus, RND1 a été identifié comme un gène suppresseur de tumeur dans le sein (Okada et al., 2015). Pour ces deux raisons, nous avons choisi de focaliser la suite de mes travaux sur ce gène.

Les deux objectifs suivants de ma thèse ont été de caractériser l'induction de RND1 en réponse à la CPT et de déterminer le rôle de RND1 dans la réponse cellulaire à la CPT.

RESULTATS

PARP-1-dependent RND1 transcription induced by topoisomerase I cleavage complexes confers cellular resistance to camptothecin

Laetitia Mouly^{1,2}, Kenza Mamouni^{1,2}, Remi Gence^{1,2}, Agnese Cristini^{1,2}, Julia Cherier¹,
Adrien Castinel², Morgane Legrand², Gilles Favre^{1,2}, Olivier Sordet^{1#*}, Sylvie Monferran^{1,2#*}

1. Cancer Research Center of Toulouse, INSERM UMR1037, Toulouse, France

2. Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Toulouse III, Toulouse, France.

* These authors contributed equally to this work.

To whom correspondence should be addressed.

-Tel: +33 (0)5 82 74 16 15; Fax: +33 5 82 74 16 85 ; Email: sylvie.monferran@inserm.fr,

Present Address: Sylvie Monferran, Cancer Research Center of Toulouse, UMR1037, Toulouse, 31037, France

-Tel: +33 (0)5 82 74 16 11 ; Fax: +33 5 82 74 16 85 ; Email: olivier.sordet@inserm.fr, Present

Address: Sylvie Monferran, Cancer Research Center of Toulouse, UMR1037, Toulouse, 31037, France

Running title: RND1 decreases apoptosis induced by camptothecin

Keywords: RND1 / PARP-1 / Topoisomerase I / Transcription / Apoptosis

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no potential conflicts of interest.

FUNDING

This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer Comité Départemental 31; the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche [doctoral fellowship to A.C.], the Fondation pour la Recherche Médicale [FDT20140931166; doctoral fellowship to A.C.], Région Midi-Pyrénées-INSERM [R14075BB doctoral fellowship to L.M.].

ABSTRACT

RHO GTPases regulate essential functions such as the organization of the actin cytoskeleton. The classic members cycle between an active GTP-bound and an inactive GDP-bound conformation whereas atypical members are predominantly GTP-bound. Besides their well-established role, the classic RHO GTPases RHOB and RAC1, are rapidly induced and/or activated by genotoxic stress and contribute to the DNA damage response. Here, we used camptothecin, a selective topoisomerase I (TOP1) inhibitor that stabilizes TOP1 cleavage complexes (TOP1cc), to search for other potential early DNA damage-inducible RHO GTPase genes. We identified that an atypical RHO GTPase, *RND1*, is rapidly induced by camptothecin. *RND1* induction is closely associated with the presence of TOP1cc induced by camptothecin or by DNA lesions that elevate TOP1cc levels such as UV and hydrogen peroxide. We further demonstrated that camptothecin increases *RND1* gene transcription and mRNA stability. Camptothecin also increases Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) activity, whose inhibition reduces *RND1* transcription. In addition, overexpression of RND1 increases PARP-1, suggesting a crosstalk between PARP-1 and RND1. Finally, RND1 protects cells against camptothecin-induced apoptosis and hence, favors cellular resistance to CPT. Together, these findings highlight RND1 as an atypical RHO GTPase early induced by a TOP1cc and show that TOP1cc-PARP-1-RND1 pathway protects cells against apoptosis induced by camptothecin.

INTRODUCTION

The RHO GTPase family comprises 20 members in human, which can be divided into classic and atypical members ¹. Classic RHO GTPases, such as RHOB and RAC1, cycle between an active GTP-bound and an inactive GDP-bound conformation. Atypical RHO GTPases, such as RND1, are unable to hydrolyze GTP and are therefore in a constitutive active GTP-bound conformation ^{2,3}. Other atypical members, such as RHOU, and presumably also RHOV, have a high nucleotide exchange rate and hence are assumed to be mainly GTP-bound ⁴. Consequently, the tight control of the expression of atypical RHO GTPases is important to precisely tune their activity. GTP-bound RHO GTPases bind to their effectors and regulate pivotal cellular functions, including the organization of the actin and microtubule cytoskeletons, cell adhesion and cell migration ⁵.

Besides their canonical roles, the RHO GTPases RAC1 and RHOB have been implicated in the early response to DNA damage. Inhibition or deletion of RAC1 reduces the DNA damage signaling pathway upon UV light ⁶ or ionizing radiation ⁷ and, sensitizes cell to ionizing radiation ⁷ or to UV-light-induced apoptosis ⁶. Unlike RAC1 that is primarily activated in response to DNA damage without change in expression ^{7,8}, RHOB is both induced and activated ^{9,10,11}. RHOB induction by genotoxic stress, such as UV light and the topoisomerase I (TOP1) inhibitor camptothecin (CPT), is rapid and relies on increased transcription and/or transcript stability ^{9,10}. Increased expression of RHOB promotes DNA repair and confers cell resistance to genotoxic stress ⁹. At present, it is not known whether, besides RHOB, other RHO GTPases are early DNA damage-inducible genes, at the expression level.

TOP1 solves DNA topological problems that are generated during transcription and replication ¹². It relaxes DNA by forming transient TOP1 cleavage complexes (TOP1cc), which are TOP1-linked DNA single strand-breaks. After DNA relaxation, TOP1cc reverse

rapidly, and TOP1 is released as the DNA religates. The transient TOP1cc can be trapped selectively by CPT and its derivatives irinotecan and topotecan, used to treat cancers, which bind at the TOP1-DNA interface¹³. Many DNA alterations including oxidative base damages^{14, 15} and UV lesions^{16, 17} also interfere with TOP1 nicking-closing reactions and give rise to elevated levels of TOP1cc (see Table 1 in¹²). Persistent TOP1cc can lead to the production of DNA double-strand breaks during replication^{18, 19, 20} and transcription^{21, 22, 23}, and ultimately to apoptotic cell death²⁴.

An early response to long-lived TOP1cc is the interference with the progression of transcription^{13, 25}. Indeed, trapping TOP1cc by CPT inhibits transcription elongation with increasing efficiency as the genes become longer and contain more exons^{26, 27, 28}. However, genes are differentially affected by CPT and a fraction of them, primarily the short and low-expressed genes, are upregulated^{26, 27}. The mechanisms by which CPT-induced TOP1cc trapping enhanced transcription at some genes are largely unknown. Here, we identified RND1 as the first atypical RHO GTPase, which is rapidly induced at the gene level by CPT and DNA damaging agents that indirectly trap TOP1cc, such as hydrogen peroxide (H₂O₂) and UV light. We found that persistent TOP1cc increase RND1 transcription by a mechanism that depends on Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) activity, providing one of the first examples of how stabilized TOP1cc can stimulate gene transcription. Lastly, we found that increased RND1 expression reduces CPT-induced apoptosis, highlighting a protective function for the TOP1cc-PARP-1-RND1 pathway.

MATERIAL AND METHODS

Drugs, chemical reagents

CPT, H₂O₂, flavopiridol (FLV), actinomycin D, cobalt(II) chloride (CoCl₂), paclitaxel, methotrexate (MTX), 5-aza-2-deoxycytidine (5AZA) and trichostatin A (TSA) were obtained from Sigma-Aldrich, and the PARP inhibitor veliparib from Selleckchem. H₂O₂, CoCl₂ and actinomycin D were dissolved in water, MTX in 0.1 M sodium hydroxide and the other agents in DMSO.

Cell lines, culture and treatments

Human osteosarcoma (U2OS), glioblastoma (U87), and colon carcinoma (HCT116) cells, and murine melanoma (B16F10), and embryonic (NIH3T3) cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum. Primary human lung embryonic WI38 fibroblasts immortalized with hTERT were obtained from Estelle Nicolas (LBCMCP, Toulouse, France) and Carl Mann (CEA, Gif-sur-Yvette, France)²⁹ and cultured in modified Eagle's medium (MEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine and 0.1 mM non-essential amino acids. In Figure 2A, cells were irradiated at 500j/m² with a UVB lamp RMX3W system (312 nm) from BioSun (Vilber Lourmat). In all the experiments, mock samples were only treated with the vehicle.

Cell transfection and transduction

To establish U2OS shRND1 and shCtrl cell lines, 3,000 U2OS cells were transfected using jetPEI reagent (Polyplus), with 1 µg of shRNA plasmid with a sequence directed against *RND1* mRNA (GGACAGAAATCCTAGATTATT; QIAGEN) or a control sequence (GGAATCTCATTTCGATGCATAC; QIAGEN). Two days after transfection, transfected cells were seeded at low density and treated with puromycin. After two to four weeks of selection, resistant clonal cells appeared, were removed with cloning cylinder and then amplified.

For transient transfection in Figure 6E, 1.5 million U2OS cells were transfected with 10 µg of p-EGFP-RND1 (Addgene) or with 10 µg of p-EGFP (Clontech) using jetPEI reagent (Polyplus) according to the manufacturer's protocol. Forty-eight hours after transfection, cells were sorted by FACS in either GFP-positive or GFP-negative RND1.

To establish U2OS RND1-V5 cell lines, 20,000 (for RND1-V5-high) or 40,000 (for RND1-V5-low) U2OS cells were transduced in complete medium with 10 µg/mL of polybrene with lentiviral particles (MOI of 5:1) containing the pLX317-puromycin-RND1-V5 (which contains the cDNA of *RND1*; Sigma-Aldrich) or a control sequence (tGFP; Sigma-Aldrich). Three days after transduction, cells were selected with puromycin.

Quantitative reverse transcription-PCR

Total RNAs were extracted using the RNeasy Plus mini kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions and the concentration and purity of RNA were determined using the Nanodrop ND-1000. RNA were reverse transcribed using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). qPCR analyses were performed on a CFX96 real-time system device (Bio-Rad) by using IQ SYBR green Supermix (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. All samples were analyzed in triplicate, and actin, GAPDH and 28S mRNA were used as endogenous controls in the $\Delta\Delta CT$ analysis. The human (*h*) and mouse (*m*) primer pairs used were *hRHOA*-FW (5'-TGG AAG ATG GCA TAA CCT GTC-3') and *hRHOA*-RV (5'-AAC

TGG TGG CTC CTC TGG-3'), *hRHOB*-FW (5'-TTG TGC CTG TCC TAG AAG TG-3') and *hRHOB*-RV (5'-CAA GTG TGG TCA GAA TGC TAC-3'), *hRHOC*-FW (5'-TGT CAT CCT CAT GTG CTT CTC-3') and *hRHOC*-RV (5'-GTG CTC GTC TTG CCT CAG-3'), *hRAC1*-FW (5'-AGA ACA CCG AGC ACT GAA C-3') and *hRAC1*-RV (5'-ACG CAT CTG AGA ACT ACA TAG G-3'), *hRAC2*-FW (5'-GGA CAG CAA GCC AGT GAA C-3') and *hRAC2*-RV (5'-GGA GAA GCA GAT GAG GAA GAC-3'), *hRAC3*-FW (5'-GTG ATG GTG GAC GGG AAA C-3') and *hRAC3*-RV (5'-CAC TTG GCA CGA ACA TTC TC-3'), *hRHOG*-FW (5'-CCG CTC TCA CTT CCT TCTC-3') and *hRHOG*-RV (5'-ACC ACC ACG CAC TTG ATG-3'), *hCDC42*-FW (5'-GTC AAG TAT GTG GAG TGT TCT G-3') and *hCDC42*-RV (5'-CAC CTG CGG CTC TTC TTC-3'), *hRHOJ* (QIAGEN; QT00092078), *hRHOQ*-FW (5'-TAT GCC AAC GAC GCC TTC-3') and *hRHOQ*-RV (5'-GCC GTG TCA TAG AGT CCT AG-3'), *hRHOD*-FW (5'-GAT TGG AGC CTG TGA CCT AC-3') and *hRHOD*-RV (5'-GTA ATC CGC CGC CAG AAG-3'), *hRHOF*-FW (5'-CAG ACAG ACCT CAC GAC AG-3') and *hRHOF*-RV (5'-AGT TCC AGA ATG TTC CAA GAG-3'), *hRHOU*-FW (5'-CGG TGG TGT CTG TGG ATG-3') and *hRHOU*-RV (5'-GAA GAT GTC TGT GTT GGT GTA G-3'), *hRHOV*-FW (5'-CAT AGC AAG TAG TAG GCA GGA G-3') and *hRHOV*-RV (5'-TCA GAG TGG GCA GTT AGA GG-3'), *hRND1a*-FW (5'-GCA AGT GTT AGC GAA GGA-3') and *hRND1a*-RV (5'-GCA GAG TGG ACG GAC A-3'), *hRND1b*-FW (5'-CGC TCT GAA CTC ATC TCT TC-3') and *hRND1b*-RV (5'-CCA TTC CTG TCT CCT TCC AA-3'), *mRND1*-FW (5'-CAG TTG GGC GCA GAA ATC TAC-3') and *mRND1*-RV (5'-TGG GCT AGA CTT GTT CAG ACA-3'), *hRND2* (QIAGEN QT00219891), *hRND3*-FW (5'-CCT GCT CCT CTC GCT CTC-3') and *hRND3*-RV (5'-TCT GGC TGG CTC TTC TCT C-3'), *hRhoH*-FW (5'-TTC ACC TCC GAG ACC TTC C-3') and *hRHOH*-RV (5'-GCC ACA GAG TAG CAC ATC AG-3'), *hRHOBTB1*-FW (5'-TGG AGC GTT CTC GGG ATG T-3') and *hRHOBTB1*-RV (5'-CGA AAA ACA GAG GAC CAC AAC A-3'), *hRHOBTB2*-

FW (5'-CAG CCA GCT TTG ACG TGT G-3') and *hRHOB2*-RV (5'-TTG CCC CGT AAG ATC CCG T-3'), *actin*-FW (5'-TCC CTG GAG AAG AGC TAC GA-3') and *actin*-RV (5'-AGG AAG GAA GGC TGG AAG AG-3'), *GAPDH*-FW (5'-CAG TTG GGC GCA GAA TCT AC-3') and *GAPDH*-RV (5'-TGG GCT AGA CTT GTT CAG ACA-3') and *28S*-FW (5'-TCG CTG GGT CTT GGA TGT-3') and *28S*-RV (5'-AGC AGA TTG TGA CAG ACC ATT CC-3'). *hRND1a* primers were designed at exons 1 and 3 and *hRND1b* primers at exon 5. *hRND1a* primers were used to perform experiments showed in Figure 1A, Figure 1B, Figure 1C, Figure 1D (for U87 and HCT116 cells), Figure 1F, Figure 2A (for UVB) and Figure 2B. *hRND1b* primers were used to perform all the other RT-qPCR experiments.

Cell extracts and immunoblotting

Whole cell extracts were obtained by lysing cells in 1% SDS and 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) supplemented with protease inhibitors (Sigma-Aldrich) and phosphatase inhibitors (Halt phosphatase inhibitor cocktail; ThermoFisher). Viscosity of the samples was reduced by brief sonication. To detect PAR, cell extraction was performed as described previously³⁰. Proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with the following antibodies: anti-actin (MAB1501; Millipore), anti-HIF1 α (NB100-449; Novus), anti-Tubulin (T5168; Sigma-Aldrich), anti-V5 tag (46-0705; Invitrogen), anti-PAR (AM80-100UG; Millipore), anti-PARP-1 (9542; Cell Signaling), anti-cleaved caspase-3 (9664; Cell Signaling) and anti-caspase-9 (9502; Cell Signaling). Immunoblotting was revealed by chemiluminescence using ChemiDoc MP System (Bio-Rad). Quantification of protein levels was done with Image Lab software (version 4.1).

WST-1 cell viability assays

GFP-positive or GFP-negative *RND1* sorted cells (Astrios, Beckman) were immediately seeded in triplicate into 96-well microplates at a density of 1,000 cells per well. Twenty-four hours after plating, cells were treated with increasing concentrations of CPT (from 1.6 nM to 25 μ M) and cultured for 72 h. The WST-1 reagent (Roche Diagnostics) was then applied for 1 h at 37°C. The formazan dye was quantified at 450 nm using a plate reader (FLUOstar Optima, BMG Labtech). Data were expressed as the percentage of cell survival (mean $\pm$ SD of treated cells normalized to the mean $\pm$ SD of untreated cells, which was set to 100%).

Clonogenic assays

Three hundred U2OS shCtrl or sh*RND1* cells were treated with increased concentrations of CPT (from 1.25 nM to 20 nM). Ten days after CPT treatment, cells were fixed with 3,7 % paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) and stained with 1% crystal violet (Sigma). Colonies containing more than 50 cells were counted.

Nascent RNA transcripts analysis

Nascent RNAs were labelled and captured using the Click-iT Nascent RNA capture kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. A 2-h 5-ethynyl uridine (EU) pulse at the concentration of 0.2 mM was performed to label nascent RNAs. Three to seven μ g of total RNA was used for the Click reaction.

Luciferase reporter assay

To study the activity of *RND1* promoter, three plasmids were used: pGL3-basal promoter-enhancer1*RND1*-lucF (kindly provided by Dr Tan, Tianjin, China), pGL3-basal promoter*RND1*-lucF and pGL3-promoter-enhancer2*RND1*-lucF (kindly provided by Dr Minami, Tokyo, Japan). Using jetPRIME reagent (Polyplus), 60,000 U2OS cells were

transiently cotransfected with 2 µg pGL3-*RND1*/promoter plasmid and 20 ng of pRL-CMV (Promega). Luciferase activities were measured 24 h after transfection by using the Dual Luciferase assay system (Promega). All data were normalized by Renilla luciferase luminescence derived from the cotransfected pRL-CMV as described previously ³¹.

Meta-analysis of *RND1* mRNA expression

This analysis was performed using the online NextbioResearch tools (<http://www.nextbio.com/>). We collected *RND1* mRNA expression fold change after treatment with CPT or derivatives in different cancer cells (OCI-LY3 cells: diffuse large B cell lymphoma; MCF-7: breast cancer cells; PC3: prostate cancer cells or HCT116: colon cancer cells) or tissue (bone marrow from rats) from seven gene expression datasets. GEO accession numbers of gene expression datasets in order of appearance: GSE63902 ³², GSE51068 ³³; GSE18552 ³⁴; GSE5258 ³⁵ and GSE37352 ²⁶.

Detection of TOP1 cleavage complexes

Cellular TOP1 cleavage complexes (TOP1cc) were detected as previously ²¹, using the rabbit monoclonal anti-TOP1 antibody from Abcam (ab109374).

Flow cytometry

For sub-G1 analysis, cells were fixed with 70% ethanol, incubated with RNase A (Sigma-Aldrich) and stained with propidium iodide (PI; Molecular probes). The stained cells were analyzed on a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences). Analysis was performed with the BD Accuri C6 flow cytometer software.

Immunofluorescence

Fifteen thousand U2OS cells were seeded on glass coverslips. After treatment, cells were washed with PBS fixed in 3.7% paraformaldehyde for 10 min and permeabilized with 0.2% Triton X-100/1% bovine serum albumin (BSA)/PBS buffer for 5 min. Cells were incubated with 10% BSA for 30 min to block non-specific binding before incubation with anti-tubulin primary antibody (clone B-5-1-2; Sigma) diluted in 5% BSA/PBS buffer for 2 h. After washes, cells were incubated with secondary antibody (Alexa Fluor 594 Phalloidin; Thermo Fisher Scientific) diluted in 5% BSA/PBS buffer for 1 h. After washes, slides were mounted using a moewiol mounting solution containing 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) to counterstained the DNA. Slides were visualized at room temperature by using an inverted confocal microscope (LSM 780; Carl Zeiss).

RESULTS

***RND1* transcripts are rapidly induced by CPT.**

To determine the RHO GTPases that are induced early in response to CPT, we treated human osteosarcoma U2OS cells for short times (1 h and 2 h), and analyzed RHO GTPase mRNA expression by reverse transcription followed by qPCR (RT-qPCR). Among the RHO GTPases family, the two atypical members *RND1* and *RHOV*, were increased by CPT with *RND1* displaying an approximately 4 and 12 folds' increase after 1 h and 2 h, respectively, and *RHOV* an approximately 3 and 4 folds' increase (Figure 1A). *RHOB* also increased under these conditions (Figure 1A), as previously reported⁹. Among the two newly identified RHO GTPases, *RND1* and *RHOV*, which are induced early by CPT (Figure 1A), we further characterized *RND1*.

Kinetics of *RND1* mRNA induction in U2OS cells showed that at 25 μ M of CPT, *RND1* increased within 1 h and reached a plateau after 2 h (Figure 1B). To investigate whether the induction of *RND1* mRNA was dose-dependent, cells were treated for 2 h with

increasing CPT concentrations. *RND1* induction was detected at 1 μ M and increased with increasing concentrations of CPT (Figure 1C). *RND1* induction was also observed in other human cell lines (glioblastoma U87, colon carcinoma HCT116, primary lung WI38 hTERT), and mouse cell lines (embryonic NIH3T3, melanoma B16F10) treated with CPT (Figure 1D). Meta-analysis of microarray databases further supports the increase of *RND1* mRNA levels after short treatment with CPT or its water-soluble derivatives, topotecan and irinotecan, in human and rodent cell lines, and in tissues (Figure 1E). In contrast, the two *RND1* homologs, *RND2* and *RND3* were not induced after a short treatment with CPT in the cell lines analyzed (Figure 1A, supplemental Figure 1A and 1B).

As other groups³⁶, we could not find or generate high-affinity antibodies that react specifically with endogenous *RND1*. Therefore, to determine whether the increase in *RND1* transcript levels could be associated with an increase in *RND1* protein levels in CPT-treated cells, we generated U2OS cells stably expressing low or high levels of V5-tagged *RND1* transcripts (Figure 1F). Cells with low and high levels of *RND1* transcripts (Figure 1F) expressed low and high levels of *RND1*-V5 protein (Figure 1G), respectively, suggesting that increasing *RND1* transcript expression also increases *RND1* protein levels. Altogether, these results identify *RND1* as a new early-inducible RHO GTPase gene in response to CPT.

***RND1* transcripts are closely associated with the presence of TOP1cc**

CPT has for sole cellular target the TOP1cc¹³. To assess whether TOP1cc stabilization by CPT primes the increase of *RND1* mRNA levels, we examined whether other agents that induce TOP1cc would also induce *RND1*. Oxidative- and UV-mediated DNA lesions give rise to elevated levels of TOP1cc (see Table 1 in¹²). As a result, hydrogen peroxide and UV light have been reported to induce cellular TOP1cc^{17, 37}. Figure 2A shows that both agents increased *RND1* mRNA levels. Conversely, agents that do not induce TOP1cc, including the

hypoxia-mimicking agent cobalt (II) chloride (CoCl₂), the dihydrofolate reductase inhibitor methotrexate, and the tubulin inhibitor paclitaxel, did not increase *RNDI* (Figure 2B), under conditions where they exert their expected biological effects (for CoCl₂, see supplemental Figure 2A; for methotrexate, see supplemental Figure 2B; for paclitaxel, see supplemental Figure 2C).

Because CPT-induced TOP1cc are reversible³⁸, we further examined *RNDI* transcripts following CPT removal. After termination of the CPT treatment, *RNDI* mRNA returned to their baseline levels (Figure 2C, top panel) as TOP1cc reversed (Figure 2C, bottom panel). Together, these results indicate that the increase of *RNDI* transcripts is closely associated with the presence of TOP1cc.

CPT increases *RNDI* transcription and *RNDI* transcript stability

The early increase of *RNDI* mRNA in CPT-treated cells could depend on an increase in transcription and/or in transcript stability. Analysis of *RNDI* transcription by capture of nascent transcripts followed by RT-qPCR showed that CPT increased by approximately 20 folds the transcription of *RNDI* gene (Figure 3A). This increase fully reversed after the removal of CPT (Figure 3A), indicating that *RNDI* transcription is closely related to the presence of TOP1cc. To determine whether the increase of *RNDI* transcription in CPT-treated cells would depend on the activity of its promoter, we measured the activity of a luciferase reporter gene placed under the control of the *RNDI* minimal promoter either alone or together with a proximal or a distal enhancer region^{39, 40}. Figure 3B shows that CPT did not increase luciferase activity in cells transfected with each of these constructs, suggesting that the increase in *RNDI* transcription by CPT might not primarily depend on an increase activity of its minimal promoter and the tested enhancers.

Next, we compared the stability of *RNDI* mRNA between untreated and CPT-treated cells. Experiments performed in the presence of the transcription inhibitor flavopiridol showed that the half-life of *RNDI* mRNA was greatly prolonged in CPT-treated cells (Figure 3C). Similar results were obtained with the transcription inhibitor actinomycin D (Figure 3D). Altogether, these data indicate that the increase of *RNDI* transcript levels in response to CPT is associated with an increase in both *RNDI* transcription and *RNDI* transcript stability.

PARP-1 increases *RNDI* transcription in response to TOP1cc

PARP-1 can promote gene transcription^{41, 42, 43, 44} and transcript stability⁴⁵ via the addition of Poly(ADP-ribose) residues (PAR) on proteins, an activity named PARylation. Because a short time CPT treatment increases PARP-1 activity³⁰, we examined whether PARP-1 could promote the increase in *RNDI* transcript levels in CPT-treated cells.

As reported³⁰, CPT increased protein PARylation (Figure 4A). Protein PARylation was reversible and returned to its baseline level after CPT removal (Figure 4A), a similar effect to that of *RNDI* mRNA levels (Figure 2C) and *RNDI* gene transcription (Figure 3A). Then, we assessed whether inhibiting PARP-1 activity would prevent the induction of *RNDI* mRNA. The PARP-1 inhibitor veliparib partially prevented the induction of *RNDI* mRNA in response to CPT (Figure 4B) under conditions where it prevented protein PARylation (Figure 4A). Then, we asked whether PARP inhibition would decrease *RNDI* transcription and/or *RNDI* transcript stability. In CPT-treated cells, veliparib strongly inhibited *RNDI* transcription (Figure 4C), while it did not decrease the half-life of *RNDI* transcripts (Figure 4D). Altogether, these results suggest that, in CPT-treated cells, TOP1cc stabilization increases PARP-1 activity, which in turn increases the transcription of *RNDI* gene, leading to an increase of *RNDI* transcripts.

RND1 increases PARP-1 expression in a positive feedback loop

Next, we considered whether there is a cross talk between PARP-1 and RND1 or whether the talk is limited to one direction in which PARP-1 induces RND1. To test this, we asked whether modulating RND1 expression would modulate PARP-1 expression. Downregulation of *RND1* mRNA levels by shRNA in U2OS cells (Figure 5A), decreased PARP-1 expression (Figure 5B). Conversely, U2OS cells overexpressing RND1 (characterized in Figures 1F,G), also overexpressed PARP-1 (Figure 5C). These results suggest that PARP-1 activity increases RND1, which in turn increases PARP-1 expression in a positive feedback loop.

RND1 reduces the sensitivity of cells exposed to CPT

To assess the potential role of RND1 in the cellular response to TOP1cc stabilization, we first compared the sensitivity of shCtrl and shRND1 U2OS cells (characterized in Figure 5A) to CPT treatment. Cells were treated with increasing concentrations of CPT, and CPT sensitivity was assessed by clonogenic assays. Figures 6A,B show that shRND1 cells formed significantly less clones in response to CPT than shCtrl cells. The increase in sensitivity of shRND1 cells to CPT was further associated with an increase of apoptotic marks such as sub-G1 population (Figure 6C), and the cleavage of caspase-9, caspase-3 and PARP-1 (Figure 6D). Conversely, overexpression of RND1 in U2OS cells (Supplemental Figure 3) decreased cell sensitivity to CPT as measured by WST-1 survival assays (Figure 6E) and decreased apoptotic marks (Figure 6F). Together, these results demonstrate that RND1 protects cells against CPT, likely by preventing apoptosis.

DISCUSSION

Here we identified RND1 as an early inducible RHO GTPase gene in response to CPT. This is the first time that an atypical RHO is reported to respond early to DNA damaging agents. Our

data support a model depicted in Figure 7 in which CPT-induced TOP1cc stabilization increases PARP-1 activity that triggers *RND1* transcription, which elevates the levels of *RND1* transcripts (and likely also the protein). In turn, the increase of RND1 protein levels promotes an increase of PARP-1 protein levels, suggesting a positive feedback loop between PARP-1 and RND1 in response to CPT. The increase of RND1 induced by the TOP1cc-PARP-1 pathway protects cells against CPT, likely by inhibiting apoptosis. PARP-1-independent pathways probably also contribute to the increase of *RND1* transcript levels, as the inhibition of PARP-1 activity with veliparib does not completely suppress CPT-induced *RND1* transcripts. Such pathways might involve an increased stability of *RND1* transcripts as our analysis shows that CPT extends the half-life of *RND1* mRNA in a PARP-1-independent manner.

Our study uncovers the close relationship between TOP1cc and the transcription of *RND1*. Indeed, CPT, which induces *RND1* transcription, has for sole cellular target the TOP1cc¹³, and reversion of TOP1cc following termination of the CPT treatment readily restores the baseline levels of *RND1* transcription and *RND1* transcripts. In addition, hydrogen peroxide and UV light, which induce DNA lesions that interfere with TOP1 nicking-closing activity and give rise to elevated levels of TOP1cc^{14, 16, 17, 37}, also increase *RND1* transcript levels. Besides TOP1 inhibitors and DNA alterations (see Table 1 in¹²), several other processes lead to persistent TOP1cc, including ribonucleotide incorporation into DNA^{46, 47, 48}, genetic defects such as ATM defect⁴⁹, and transcriptional activation⁵⁰. Hence, the increased transcription of *RND1* due to TOP1cc stabilization might be a frequent event occurring under both physiological and stress conditions.

An early response to CPT is the global inhibition of transcription^{21, 51}. However, genes are differentially affected by CPT and a fraction of them, primarily the short and low-expressed genes, are upregulated^{26, 27, 28}. In accordance with this, *RND1* is a short gene (8.7

Kbp), with a low-expression in most healthy tissues apart from brain and liver ² and in addition, *RND1* expression is significantly down regulated in several aggressive tumors compared to normal tissues ^{36, 52, 53}. The mechanisms by which CPT enhances transcription of some genes are largely unknown. Here we reported that CPT induces PARP-1 activity, which in turn stimulates *RND1* transcription. This effect is likely related to TOP1cc. Similar to CPT, H202 and UV light, induce persistent TOP1cc ^{17, 37}, increase *RND1* transcript levels (this study), and also increase PARP-1 activity ^{54, 55}. Whether TOP1cc-induced PARP-1 activity is a common mechanism for CPT to promote gene transcription or whether it is restricted to *RND1* gene remains to be investigated.

It is now well documented that PARP-1 regulates transcription ⁵⁶ besides from its well-recognized role in DNA repair ⁵⁷. PARP-1 is enriched to the promoters of actively transcribed genes ⁵⁸ and, stimulates transcription initiation by maintaining an ‘open’ chromatin environment through PARylation of core histones and exclusion of histone H1 from the DNA ^{43, 58}, or inhibition of histone H3K4me demethylation by KDM5B ⁴². PARP-1 could also promote transcription by stimulating transcription elongation. PARP-1 PARylates subunits of the negative elongation factors (NELF), NELF-A and NELF-E, which triggers the release of RNA polymerase II from its paused site for productive elongation ⁴⁴. Our results showing that increased *RND1* transcription by CPT does not relies on increased activity of its promoter suggest that PARP-1 might primarily function in stimulating transcription elongation of *RND1* gene. PARP-1-independent pathways probably also contribute to the increase of *RND1* transcription, as PARP-1 inhibition does not completely suppress CPT-induced *RND1* transcription. A previous study shows that the CPT derivatives topotecan can stimulate *UBE3A* transcription by downregulating the expression of its antisense transcript ⁵⁹. The non-coding RNA AGAP2-AS1 has been reported to inhibit *RND1* transcription ^{60, 61}, which raises

the possibility that CPT could inhibit AGAP2-AS1 transcription, which in turn could increase *RND1* transcription.

Lastly, our analysis shows that RND1 protects cells against CPT-induced apoptosis and hence favors cell resistance. These findings extend the role of RND1 beyond its original function in the disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion² as well as in embryonic development, where it promotes the formation and maturation of neuronal protrusions^{62, 63} and controls gastrulation movements⁶⁴. In addition, RND1 behaves as a tumor suppressor gene. *RND1* expression levels decrease in several aggressive tumors^{36, 52, 53}, and RND1 loss in immortalized mammary cells can initiate breast tumorigenesis and promotes metastasis³⁶. Even in tumor cell lines expressing low levels of RND1 such as MCF-7 cells³⁶, U87 cells⁵² and U2OS cells, RND1 could be transiently induced by TOP1cc to resist to CPT derivatives. This potential selective advantage of tumor cells suggests that inhibiting RND1-dependent signaling could sensitize them to CPT derivatives.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank E. Nicolas for WI38 hTERT cells, Dr Tan for pGL3-basal promoter enhancer 1 *RND1*-lucF, Dr Minami for pGL3-basal promoter *RND1*-lucF and pGL3-promoter enhancer 2 *RND1*-lucF, Pr Moyal and Dr Toulas for the lentiviral particles. We thank Manon Farce for her kind technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. Haga RB, Ridley AJ. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases* 2016, **7**(4): 207-221.

2. Nobes CD, Lauritzen I, Mattei MG, Paris S, Hall A, Chardin P. A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol* 1998, **141**(1): 187-197.

3. Riou P, Villalonga P, Ridley AJ. Rnd proteins: Multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *Bioessays* 2010, **32**(11): 986-992.

4. Shutes A, Berzat AC, Cox AD, Der CJ. Atypical mechanism of regulation of the Wrch-1 Rho family small GTPase. *Curr Biol* 2004, **14**(22): 2052-2056.

5. Lawson CD, Ridley AJ. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol* 2017.

6. Deshmukh J, Pofahl R, Haase I. Epidermal Rac1 regulates the DNA damage response and protects from UV-light-induced keratinocyte apoptosis and skin carcinogenesis. *Cell Death Dis* 2017, **8**(3): e2664.

7. Yan Y, Greer PM, Cao PT, Kolb RH, Cowan KH. RAC1 GTPase plays an important role in gamma-irradiation induced G2/M checkpoint activation. *Breast Cancer Res* 2012, **14**(2): R60.

8. Espinha G, Osaki JH, Magalhaes YT, Forti FL. Rac1 GTPase-deficient HeLa cells present reduced DNA repair, proliferation, and survival under UV or gamma irradiation. *Mol Cell Biochem* 2015, **404**(1-2): 281-297.

9. Mamouni K, Cristini A, Guirouilh-Barbat J, Monferran S, Lemarie A, Faye JC, *et al.* RhoB Promotes gammaH2AX Dephosphorylation and DNA Double-Strand Break Repair. *Mol Cell Biol* 2014, **34**(16): 3144-3155.

10. Canguilhem B, Pradines A, Baudouin C, Bobby C, Lajoie-Mazenc I, Charveron M, *et al.* RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 2005, **280**(52): 43257-43263.
11. Fritz G, Kaina B, Aktories K. The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J Biol Chem* 1995, **270**(42): 25172-25177.
12. Pommier Y, Sun Y, Huang SN, Nitiss JL. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016, **17**(11): 703-721.
13. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(10): 789-802.
14. Pourquier P, Ueng L-M, Fertala J, Wang D, Park H-J, Essigman JM, *et al.* Induction of reversible complexes between eukaryotic DNA topoisomerase I and DNA-containing oxidative base damages. *J Biol Chem* 1999, **274**: 8516-8523.
15. Leshner DT, Pommier Y, Stewart L, Redinbo MR. 8-Oxoguanine rearranges the active site of human topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(19): 12102-12107.
16. Lanza A, Tornaletti S, Rodolfo C, Scanavini MC, Pedrini AM. Human DNA topoisomerase I-mediated cleavages stimulated by ultraviolet light-induced DNA damage. *J Biol Chem* 1996, **271**(12): 6978-6986.
17. Subramanian D, Rosenstein BS, Muller MT. Ultraviolet-induced DNA damage stimulates topoisomerase I-DNA complex formation in vivo: possible relationship with DNA repair. *Cancer Res* 1998, **58**(5): 976-984.
18. Furuta T, Takemura H, Liao ZY, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, *et al.* Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* 2003, **278**(22): 20303-20312.

19. Regairaz M, Zhang YW, Fu H, Agama KK, Tata N, Agrawal S, *et al.* Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I-DNA complexes. *J Cell Biol* 2011, **195**(5): 739-749.

20. Strumberg D, Pilon AA, Smith M, Hickey R, Malkas L, Pommier Y. Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol Cell Biol* 2000, **20**(11): 3977-3987.

21. Cristini A, Park JH, Capranico G, Legube G, Favre G, Sordet O. DNA-PK triggers histone ubiquitination and signaling in response to DNA double-strand breaks produced during the repair of transcription-blocking topoisomerase I lesions. *Nucleic Acids Res* 2016, **44**(3): 1161-1178.

22. Sordet O, Nakamura AJ, Redon CE, Pommier Y. DNA double-strand breaks and ATM activation by transcription-blocking DNA lesions. *Cell Cycle* 2010, **9**(2): 274-278.

23. Sordet O, Redon CE, Guirouilh-Barbat J, Smith S, Solier S, Douarre C, *et al.* Ataxia telangiectasia mutated activation by transcription- and topoisomerase I-induced DNA double-strand breaks. *EMBO Rep* 2009, **10**(8): 887-893.

24. Sordet O, Khan QA, Kohn KW, Pommier Y. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003, **3**(4): 271-290.

25. Capranico G, Ferri F, Fogli MV, Russo A, Lotito L, Baranello L. The effects of camptothecin on RNA polymerase II transcription: roles of DNA topoisomerase I. *Biochimie* 2007, **89**(4): 482-489.

26. Solier S, Ryan MC, Martin SE, Varma S, Kohn KW, Liu H, *et al.* Transcription poisoning by Topoisomerase I is controlled by gene length, splice sites, and miR-142-3p. *Cancer Res* 2013, **73**(15): 4830-4839.

27. Veloso A, Biewen B, Paulsen MT, Berg N, Carmo de Andrade Lima L, Prasad J, *et al.* Genome-wide transcriptional effects of the anti-cancer agent camptothecin. *PLoS One* 2013, **8**(10): e78190.
28. King IF, Yandava CN, Mabb AM, Hsiao JS, Huang HS, Pearson BL, *et al.* Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism. *Nature* 2013, **501**(7465): 58-62.
29. Jeanblanc M, Ragu S, Gey C, Contrepolis K, Courbeyrette R, Thuret JY, *et al.* Parallel pathways in RAF-induced senescence and conditions for its reversion. *Oncogene* 2012, **31**(25): 3072-3085.
30. Das BB, Huang SY, Murai J, Rehman I, Ame JC, Sengupta S, *et al.* PARP1-TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage. *Nucleic Acids Res* 2014, **42**(7): 4435-4449.
31. Monferran S, Skuli N, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Cohen-Jonathan-Moyal E, *et al.* Alpha5beta3 and alpha5beta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int J Cancer* 2008, **123**(2): 357-364.
32. Davis M, Li JY, Knight E, Eldridge SR, Daniels KK, Bushel PR. Toxicogenomics profiling of bone marrow from rats treated with topotecan in combination with oxaliplatin: a mechanistic strategy to inform combination toxicity. *Front Genet* 2015, **6**.
33. Bansal M, Yang JC, Karan C, Menden MP, Costello JC, Tang H, *et al.* A community computational challenge to predict the activity of pairs of compounds. *Nat Biotechnol* 2014, **32**(12): 1213-U1269.
34. Iorio F, Bosotti R, Scacheri E, Belcastro V, Mithbaokar P, Ferriero R, *et al.* Discovery of drug mode of action and drug repositioning from transcriptional responses. *P Natl Acad Sci USA* 2010, **107**(33): 14621-14626.

35. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, *et al.* The connectivity map: Using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 2006, **313**(5795): 1929-1935.
36. Okada T, Sinha S, Esposito I, Schiavon G, Lopez-Lago MA, Su W, *et al.* The Rho GTPase Rnd1 suppresses mammary tumorigenesis and EMT by restraining Ras-MAPK signalling. *Nat Cell Biol* 2015, **17**(1): 81-94.
37. Daroui P, Desai SD, Li TK, Liu AA, Liu LF. Hydrogen peroxide induces topoisomerase I-mediated DNA damage and cell death. *J Biol Chem* 2004, **279**(15): 14587-14594.
38. Covey JM, Jaxel C, Kohn KW, Pommier Y. Protein-linked DNA strand breaks induced in mammalian cells by camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I. *Cancer Res* 1989, **49**(18): 5016-5022.
39. Shen L, Qin K, Wang D, Zhang Y, Bai N, Yang S, *et al.* Overexpression of Oct4 suppresses the metastatic potential of breast cancer cells via Rnd1 downregulation. *Biochim Biophys Acta* 2014, **1842**(11): 2087-2095.
40. Suehiro J, Kanki Y, Makihara C, Schadler K, Miura M, Manabe Y, *et al.* Genome-wide approaches reveal functional vascular endothelial growth factor (VEGF)-inducible nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 binding to angiogenesis-related genes in the endothelium. *J Biol Chem* 2014, **289**(42): 29044-29059.
41. Kim MY, Mauro S, Gevry N, Lis JT, Kraus WL. NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* 2004, **119**(6): 803-814.
42. Krishnakumar R, Kraus WL. PARP-1 regulates chromatin structure and transcription through a KDM5B-dependent pathway. *Mol Cell* 2010, **39**(5): 736-749.
43. Martinez-Zamudio R, Ha HC. Histone ADP-ribosylation facilitates gene transcription by directly remodeling nucleosomes. *Mol Cell Biol* 2012, **32**(13): 2490-2502.

44. Gibson BA, Zhang Y, Jiang H, Hussey KM, Shrimp JH, Lin H, *et al.* Chemical genetic discovery of PARP targets reveals a role for PARP-1 in transcription elongation. *Science* 2016, **353**(6294): 45-50.
45. Ke Y, Han Y, Guo X, Wen J, Wang K, Jiang X, *et al.* PARP1 promotes gene expression at the post-transcriptional level by modulating the RNA-binding protein HuR. *Nat Commun* 2017, **8**: 14632.
46. Huang SY, Ghosh S, Pommier Y. Topoisomerase I alone is sufficient to produce short DNA deletions and can also reverse nicks at ribonucleotide sites. *J Biol Chem* 2015, **290**(22): 14068-14076.
47. Kim N, Huang SY, Williams JS, Li YC, Clark AB, Cho JE, *et al.* Mutagenic processing of ribonucleotides in DNA by yeast topoisomerase I. *Science* 2011, **332**(6037): 1561-1564.
48. Sparks JL, Burgers PM. Error-free and mutagenic processing of topoisomerase 1-provoked damage at genomic ribonucleotides. *EMBO J* 2015, **34**(9): 1259-1269.
49. Katyal S, Lee Y, Nitiss KC, Downing SM, Li Y, Shimada M, *et al.* Aberrant topoisomerase-1 DNA lesions are pathogenic in neurodegenerative genome instability syndromes. *Nat Neurosci* 2014, **17**(6): 813-821.
50. Puc J, Kozbial P, Li W, Tan Y, Liu Z, Suter T, *et al.* Ligand-dependent enhancer activation regulated by topoisomerase-I activity. *Cell* 2015, **160**(3): 367-380.
51. Desai SD, Zhang H, Rodriguez-Bauman A, Yang JM, Wu X, Gounder MK, *et al.* Transcription-dependent degradation of topoisomerase I-DNA covalent complexes. *Mol Cell Biol* 2003, **23**(7): 2341-2350.

52. Clarke K, Daubon T, Turan N, Soulet F, Mohd Zahari M, Ryan KR, *et al.* Inference of Low and High-Grade Glioma Gene Regulatory Networks Delineates the Role of Rnd3 in Establishing Multiple Hallmarks of Cancer. *PLoS Genet* 2015, **11**(7): e1005325.
53. Komatsu H, Iguchi T, Masuda T, Hirata H, Ueda M, Kidogami S, *et al.* Attenuated RND1 Expression Confers Malignant Phenotype and Predicts Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2017, **24**(3): 850-859.
54. Fujimoto M, Takii R, Takaki E, Katiyar A, Nakato R, Shirahige K, *et al.* The HSF1-PARP13-PARP1 complex facilitates DNA repair and promotes mammary tumorigenesis. *Nat Commun* 2017, **8**(1): 1638.
55. Jungmichel S, Rosenthal F, Altmeyer M, Lukas J, Hottiger MO, Nielsen ML. Proteome-wide identification of poly(ADP-Ribosyl)ation targets in different genotoxic stress responses. *Mol Cell* 2013, **52**(2): 272-285.
56. Gupte R, Liu Z, Kraus WL. PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. *Genes Dev* 2017, **31**(2): 101-126.
57. Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017, **18**(10): 610-621.
58. Krishnakumar R, Gamble MJ, Frizzell KM, Berrocal JG, Kininis M, Kraus WL. Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes. *Science* 2008, **319**(5864): 819-821.
59. Huang HS, Allen JA, Mabb AM, King IF, Miriyala J, Taylor-Blake B, *et al.* Topoisomerase inhibitors unsilence the dormant allele of Ube3a in neurons. *Nature* 2012, **481**(7380): 185-189.
60. Li W, Sun M, Zang C, Ma P, He J, Zhang M, *et al.* Upregulated long non-coding RNA AGAP2-AS1 represses LATS2 and KLF2 expression through interacting with EZH2 and LSD1 in non-small-cell lung cancer cells. *Cell Death Dis* 2016, **7**: e2225.

61. Qi F, Liu X, Wu H, Yu X, Wei C, Huang X, *et al.* Long noncoding AGAP2-AS1 is activated by SP1 and promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer. *J Hematol Oncol* 2017, **10**(1): 48.
62. Ishikawa Y, Katoh H, Negishi M. A role of Rnd1 GTPase in dendritic spine formation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2003, **23**(35): 11065-11072.
63. Li YH, Ghavampur S, Bondallaz P, Will L, Grenningloh G, Puschel AW. Rnd1 regulates axon extension by enhancing the microtubule destabilizing activity of SCG10. *J Biol Chem* 2009, **284**(1): 363-371.
64. Ogata S, Morokuma J, Hayata T, Kolle G, Niehrs C, Ueno N, *et al.* TGF-beta signaling-mediated morphogenesis: modulation of cell adhesion via cadherin endocytosis. *Genes Dev* 2007, **21**(14): 1817-1831.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Rapid induction of *RND1* transcripts by CPTs

(A) RT-qPCR analysis of *RHO GTPase* mRNA in U2OS cells treated with 25 μ M CPT for the indicated times. Data were normalized to that of untreated cells, which was denoted by the dashed line (means $\pm$ SEM, $n \geq 3$). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ by two-way ANOVA. Colors are RHO GTPase sub-families. (B,C) RT-qPCR analysis of *RND1* mRNA in U2OS cells treated for the indicated times with 25 μ M CPT (B), and with the indicated CPT concentrations for 2 h (C). Data are expressed as means $\pm$ SD for $n \geq 3$. Ns = not significant, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ by one-way ANOVA. (D) RT-qPCR analysis of *RND1* mRNA in cells treated with 25 μ M CPT for 2 h (U87, HCT116, and WI38 hTERT cells) or 4 h (B16F10 and NIH3T3 cells) (means $\pm$ SD, $n \geq 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ by unpaired *t* test. (E) Meta-analysis of *RND1* expression fold change after treatment with CPT

or its derivatives irinotecan or topotecan in human cancer cells (OCI-LY3; MCF-7; PC3; HCT116) or rat tissue (bone marrow) from gene expression datasets (at least $p < 0.05$ by unpaired t test). Fold induction equals a value of 1.4 to 2 (+) or of 2.1 to 6 (++). **(F,G)** U2OS were stably expressing V5-tagged RND1 at low (RND1-V5-low) or high levels (RND1-V5-high) or EGFP (ctrl). **(F)** RT-qPCR analysis of *RND1* mRNA (means $\pm$ SD, $n = 3$). $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ by unpaired t test. **(G)** Western blotting analysis of V5 tag. Actin: loading control. Dashed lines indicate that intervening wells have been spliced out.

Figure 2. *RND1* transcripts are closely associated with the presence of TOP1cc

(A,B) RT-qPCR analysis of *RND1* mRNA in U2OS cells treated for 2 h with 1 mM H₂O₂ or irradiated with 500j/m² UVB **(A)**, or treated with 100 μ M CoCl₂, 50 μ M methotrexate or 10 μ M paclitaxel **(B)**. A treatment with CPT has been performed in parallel as a positive control (not shown). Data are expressed as means $\pm$ SD for $n = 3$. Ns = not significant, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ by unpaired t test. **(C)** U2OS cells were treated with 25 μ M CPT for 2 h and washed and cultured in CPT-free medium (CPT + Washes) for 2 h to allow reversion of TOP1cc. Top panel: *RND1* mRNA was analyzed by RT-qPCR (means $\pm$ SD, $n = 3$). $^{***}P < 0.001$ by one-way ANOVA. Bottom panel: Detection of TOP1cc. Two concentrations of genomic DNA (5 and 2.5 μ g) were probed with an anti-TOP1 antibody.

Figure 3. CPT increases *RND1* transcription and *RND1* transcript stability

(A) U2OS cells were treated with 25 μ M CPT for 1 h and washed and cultured in CPT-free medium (CPT + Washes) for 0.5 h to allow reversion of TOP1cc. At the end of each time point, 0.2 mM EU was added to the culture medium for 2 h, after which EU-labeled nascent RNAs were captured. Nascent *RND1* RNAs were then analyzed by RT-qPCR (means $\pm$ SEM, $n = 3$; except for the “CPT + Washes” time point, for which $n = 2$). $^{**}P < 0.01$ by unpaired t

test. **(B)** Left panel: Diagram of pGL3-*RND1* promoter constructs (minimal promoter alone, minimal promoter with a proximal or a distal enhancer in order of appearance). Right panel: Luciferase activity of U2OS cells treated with 25 μ M CPT for 2 h (minimal and distal promoter) or 3 h (proximal promoter). For the positive control, luciferase activity of U2OS cells treated with 1 μ M 5-aza-2'-deoxycytidine (5AZA) for 72 h and with 100 nM trichostatin A (TSA) for 24 h (means $\pm$ SD, n = 3). Ns = not significant, *P<0.05, **P<0.01 by one-way ANOVA. **(C)** U2OS cells were left untreated or were treated with 25 μ M CPT for 2 h before the addition of the transcription inhibitor flavopiridol (FLV, 1 μ M) for the indicated times. *RND1* mRNA was then analyzed by RT-qPCR and normalized to the level at the time of FLV addition (means $\pm$ SD, n = 3). ***P<0.001, ****P<0.0001, by two-way ANOVA. The half-life ($t_{1/2}$) of *RND1* mRNA is indicated. **(D)** Experiments were performed as in (C) with the transcription inhibitor actinomycin D (10 μ g/ml). A representative experiment out of two is shown (means $\pm$ SD of triplicate samples).

Figure 4. The PARP-1 inhibitor veliparib prevents CPT-induced RND1 transcription

(A) U2OS cells were treated with 25 μ M CPT for 2 h and washed and culture in CPT-free medium (CPT + Washes) for 2 h to allow reversion of TOP1cc. When indicated, cells were pretreated with 5 μ M veliparib for 1 h. The expression of PAR and PARP-1 were analyzed by Western blotting. The top panel shows quantification of PAR normalized to PARP-1 (means $\pm$ SD, n = 2). **(B)** RT-qPCR analysis of *RND1* mRNA in U2OS cells treated with 5 μ M veliparib for 1 h before the addition of CPT for 2 h (means $\pm$ SD, n $\geq$ 3). **P<0.01, ****P<0.0001 by unpaired *t* test. **(C)** U2OS cells were treated with 5 μ M of veliparib for 1 h before the addition of 25 μ M CPT for 2 h. At the end of each time point, 0.2 mM EU was added to the culture medium for 2 h, after which EU-labeled nascent RNAs were captured. Nascent *RND1* RNAs were then analyzed by RT-qPCR. Data were normalized to the level of CPT-treated cells,

which was taken at 100%. A representative experiment out of two is shown (means $\pm$ SD of triplicate samples). **(D)** U2OS cells were treated with veliparib (5 μ M, 1 h) followed by the addition of CPT (25 μ M, 1 h). After which, the transcription inhibitor FLV (1 μ M) was added for 4 h. *RND1* mRNA expression was analyzed by RT-qPCR and normalized to the level at the time of FLV addition, which was set to 100 % (means $\pm$ SD, n = 3). Ns = not significant by two-way ANOVA.

Figure 5. RND1 expression regulates PARP-1 expression

(A,C) U2OS cells were stably expressing shRNAs against RND1 (shRND1) or against a control sequence (shCtrl). **(A)** RT-qPCR analysis of *RND1* mRNA (means $\pm$ SD, n = 4). ****P<0.0001 by unpaired *t* test. **(B)** Western blotting analysis of PARP-1. The top panel shows quantification of PARP-1 normalized to actin or tubulin (means $\pm$ SD, n = 5). ***P<0.001 by unpaired *t* test. **(C)** Western blotting of analysis of PARP-1 in U2OS stably expressing high levels of V5-tagged RND1 (RND1-V5-high, see panel 1F) or EGFP (ctrl). The top panel shows quantification of PARP-1 normalized to actin (means $\pm$ SD, n = 3). *P<0.05 by unpaired *t* test.

Figure 6. RND1 protect cells against CPT-induced apoptosis.

(A,B) Colony formation assay in U2OS cells stably expressing shRNAs against RND1 (shRND1) or against a control sequence (shCtrl), and treated with increased concentrations of CPT (from 1.25 nM to 20 nM). Percentages of colonies were assessed after 10 days by counting the number of colonies and normalized to that of untreated cells, which was set at 100% (means $\pm$ SD, n = 4). Ns = not significant, *P<0.1, **P<0.01, ***P<0.001, by two-way ANOVA. **(C)** U2OS shRND1 or shCtrl cells were treated with 25 μ M CPT for 24 h. Percentage of sub-G1 cell population was analyzed by flow cytometry. The top panel shows

quantification of sub-G1 cell population for three independent experiments (means $\pm$ SEM). * $P < 0.05$ by unpaired t test. Bottom: one representative experiment is shown. **(D)** Western blotting analysis of the indicated proteins in U2OS shRND1 or shCtrl cells treated with 25 μ M CPT for 24 h. Caspase-9^{CL}: cleaved caspase-9, Caspase-3^{CL}: cleaved caspase-3, PARP-1^{CL}: cleaved PARP-1. Data shown are representatives from three experiments. **(E)** U2OS cells were transfected with pEGFP-RND1 plasmid. 48 h after transfection, GFP- and GFP+ U2OS cells were separated by cell sorting. GFP- and RND1 GFP+ U2OS cells were treated with increased concentrations of CPT (from 0.0016 μ M to 25 μ M). 72 h after treatment, cell survival was analyzed by a WST-1 assay. A representative experiment out of three is shown (means $\pm$ SD for triplicate samples). Ns = not significant, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, by two-way ANOVA. **(F)** Similar experiments as in panel **(D)** in U2OS Ctrl and RND1-V5-high cells

Figure 7. Proposed model for the induction of RND1 in response to CPT.

CPT stabilizes TOP1cc, which in turn induce apoptosis²⁴ [1]. TOP1cc also activates a PARP-1-RND1 pathway that counteracts the induction of apoptosis [2].

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary data are available at Cell Death and Differentiation online.

Figure 1

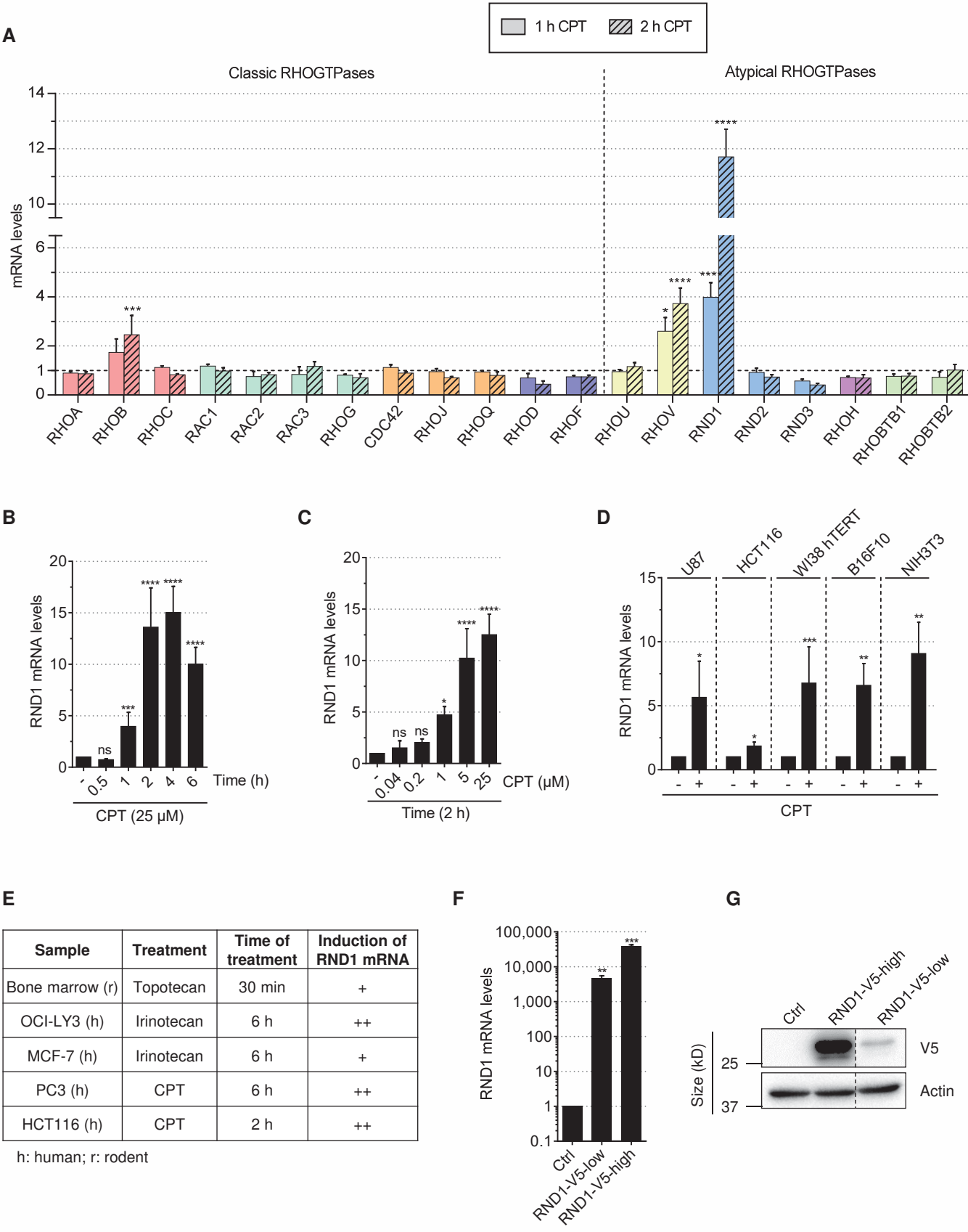
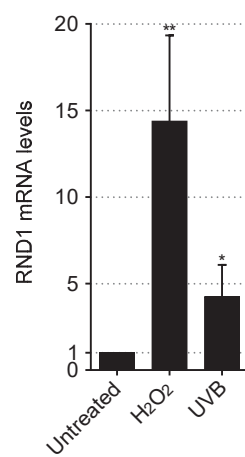
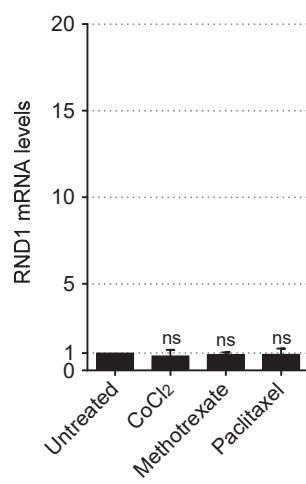


Figure 2

A



B



C

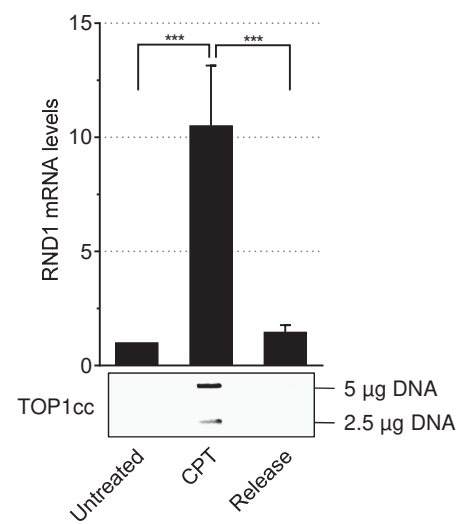


Figure 3

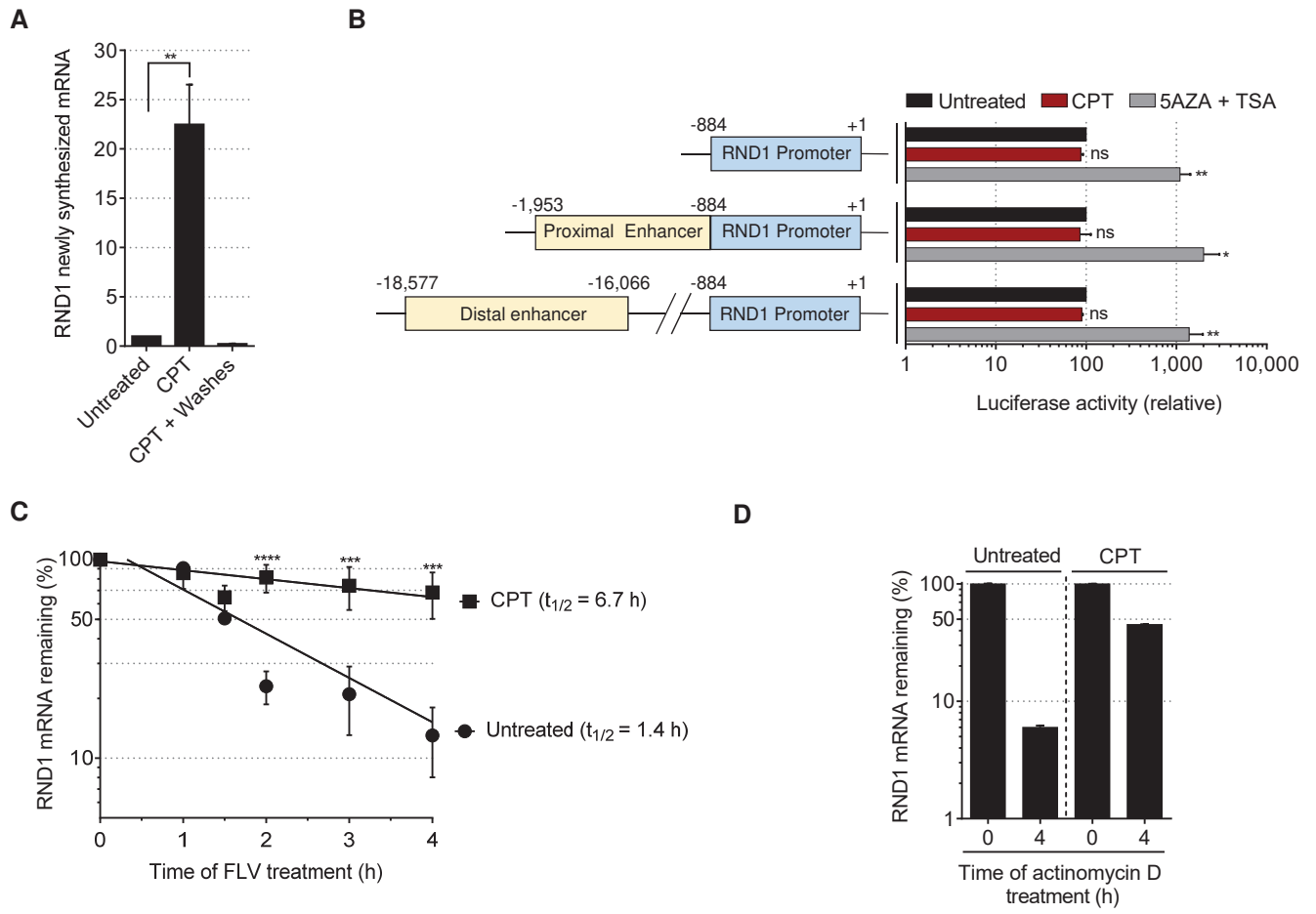
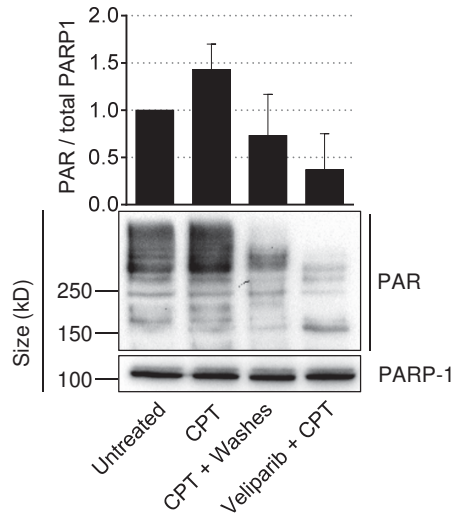
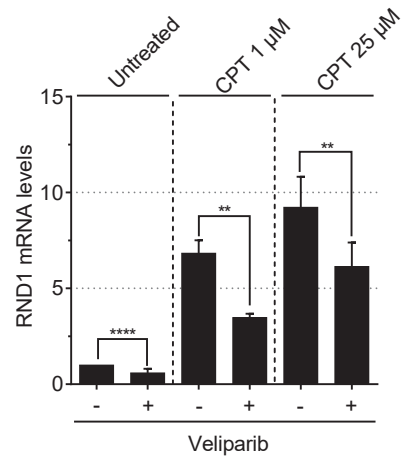


Figure 4

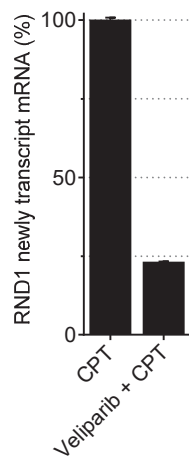
A



B



C



D

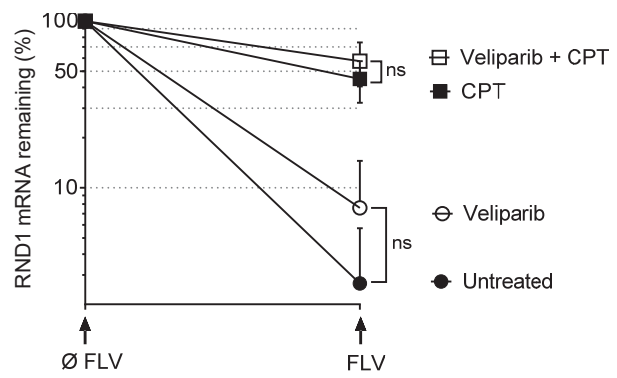
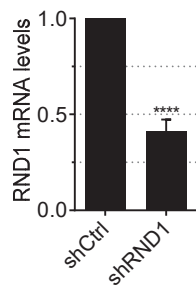
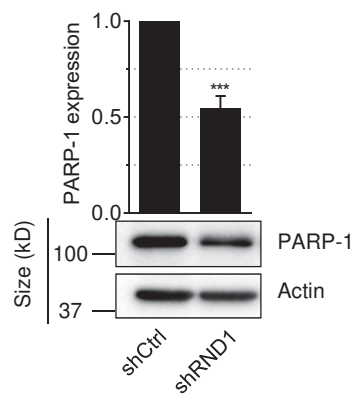


Figure 5

A



B



C

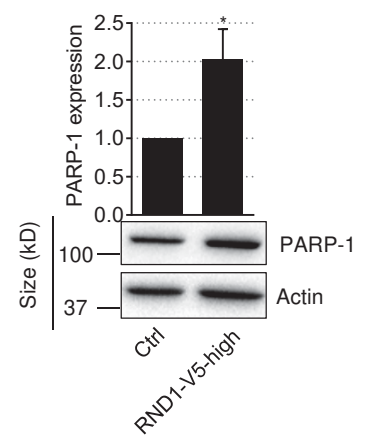


Figure 6

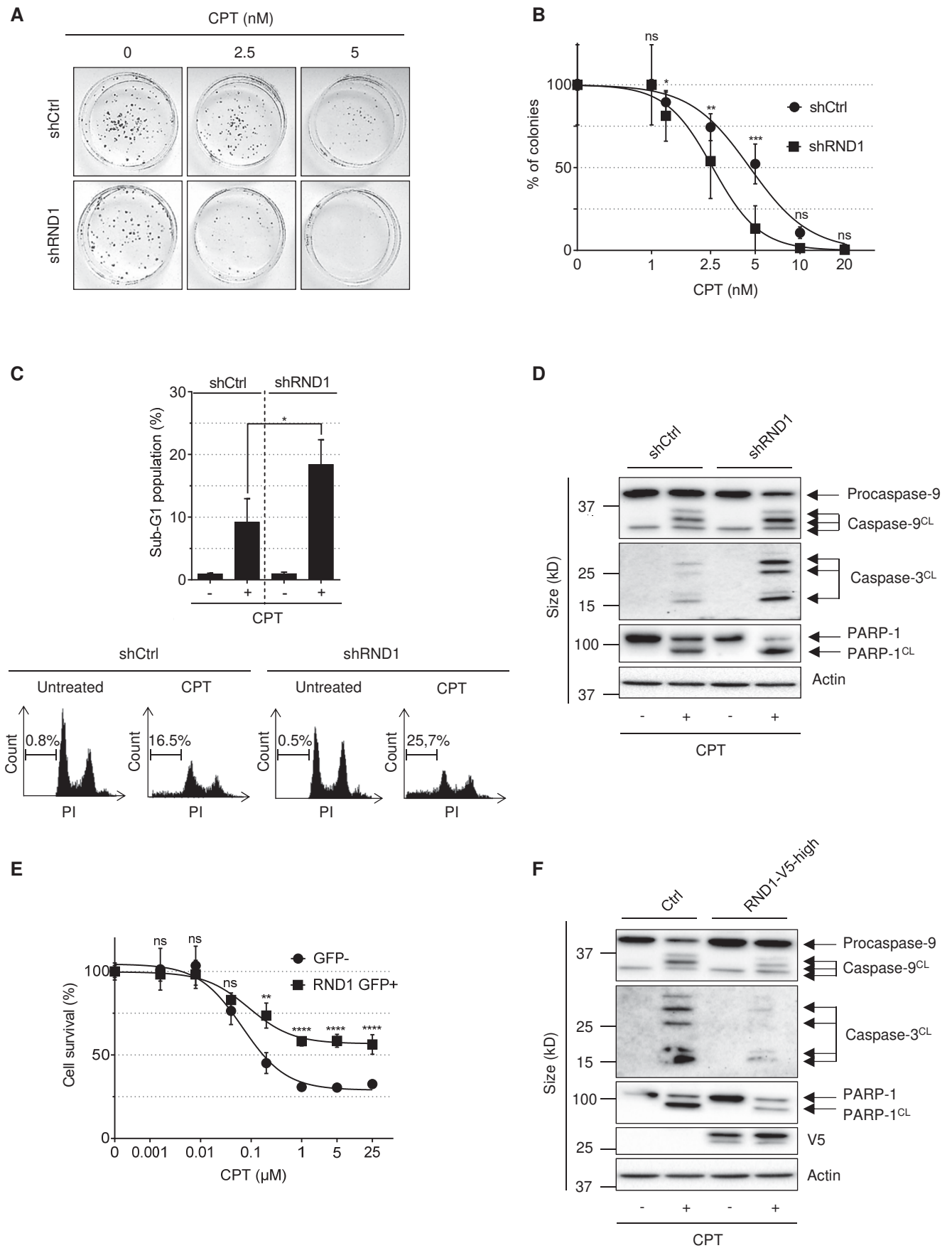
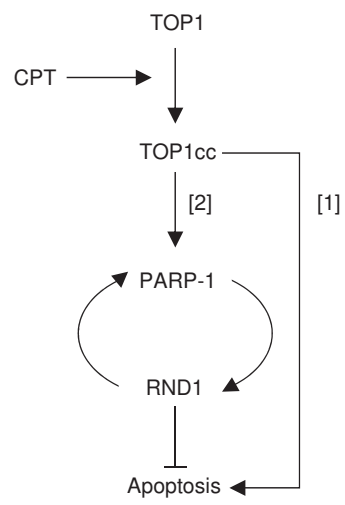


Figure 7



Supplementary Data

PARP-1-dependent RND1 transcription induced by topoisomerase I cleavage complexes confers cellular resistance to camptothecin

Laetitia Mouly, Kenza Mamouni, Remi Gence, Agnese Cristini, Julia Cherier, Adrien Castinel, Morgane Legrand, Gilles Favre, Olivier Sordet, Sylvie Monferran

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplemental Figure 1

The expression of *RND2* (A) and *RND3* (B) was analyzed by RT-qPCR in U87 and WI38 hTERT cells treated with 25 μ M CPT for 2 h (means $\pm$ SD, n = 3). Ns = not significant, **P<0.01, ****P<0.0001 by unpaired *t* test.

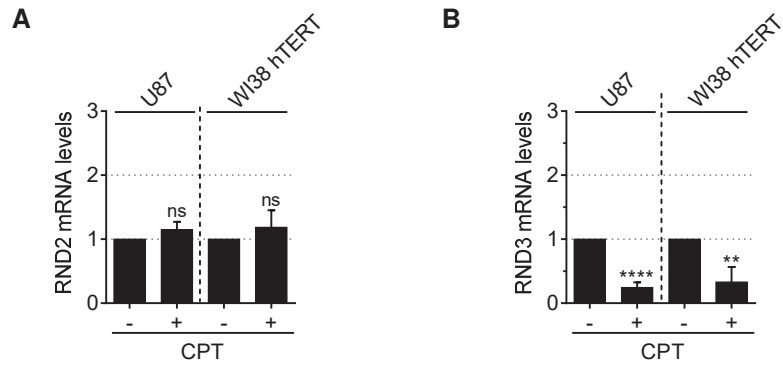
Supplemental Figure 2

(A) Western blotting of HIF1 α and actin in U2OS cells treated for 2 h with 100 μ M CoCl₂. (B) Cell survival of U2OS cells treated for 72 hours with 50 μ M methotrexate (MTX), normalized to the level of untreated cells which was set at 100%. (C) Representative images of U2OS cells treated with 10 μ M paclitaxel for 2 h, fixed and then stained for tubulin (red). DNA was counterstained with DAPI (blue).

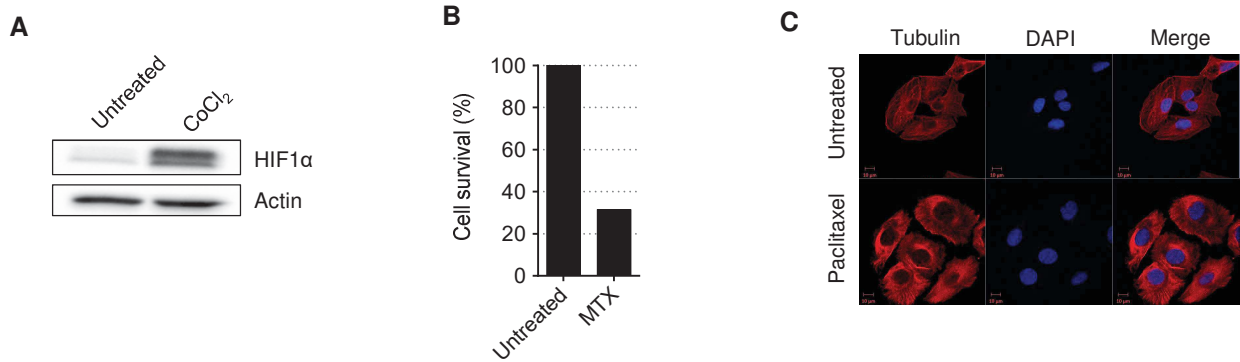
Supplemental Figure 3

U2OS cells were transfected with pEGFP-RND1 plasmid. 48 hours after transfection, GFP- and GFP+ U2OS cells were separated by cell sorting in comparison with signals observed in non-transfected cells.

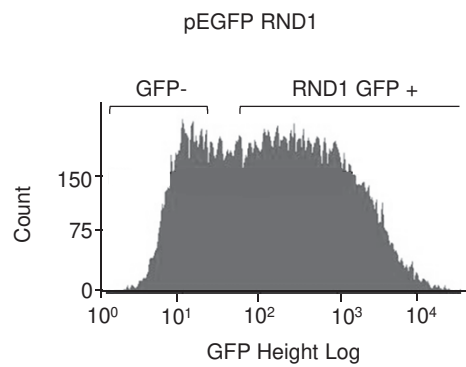
Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3



Résultats supplémentaires

1) Induction de RND1 par les analogues cliniques de la CPT

Nous avons étudié dans différents modèles cellulaires si RND1 était induit par les analogues cliniques de la CPT, l'irinotécan et le topotécan, à des temps courts (2 h) (Figure supp. 1). Dans les cellules U2OS et la lignée de cancer du poumon à petites cellules H460, la CPT ou ses analogues augmentent l'ARNm de RND1. Dans les lignées de cancer colorectal HCT116 et DLD1, La CPT ou l'irinotécan induisent une faible augmentation de l'ARNm de RND1.

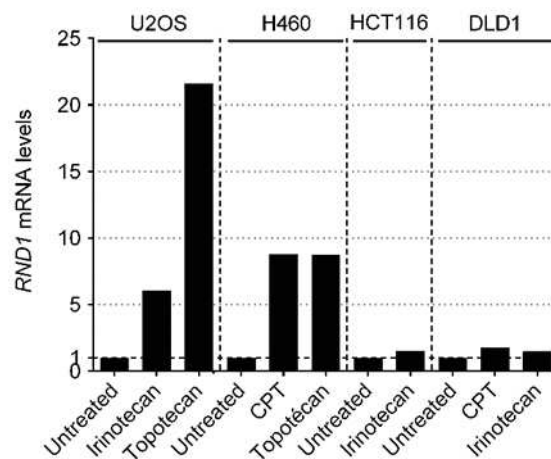


Figure supp. 1. Effets des analogues de la CPT sur l'expression de RND1 dans différentes lignées cellulaires. Les cellules U2OS, H460, HCT116 et DLD1 sont traitées par le DMSO (Untreated), la CPT ou ses analogues, l'irinotécan ou le topotécan (25 μ M, 2 h). L'expression de RND1 a été analysée par RT-qPCR N=1

2) L'induction de RND1 par les Top1cc est indépendante de la production de DSB

a) L'expression de RND1 est-elle induite par les DSB ?

Nous avons montré que l'expression de RND1 était induite par la CPT, l' H_2O_2 et les rayons UV. Ces traitements peuvent tous induire la formation de SSB qui peuvent générer des DSB lors de la collision avec une fourche de réplication (Peak and Peak, 1990; Prise et al., 1989; Ryan et al., 1991). Afin d'étudier si les DSB *per se* induisent RND1, nous avons utilisé deux sources de DSB : les radiations ionisantes et l'action d'une enzyme de restriction, AsiSI (Iacovoni et al., 2010). Comme attendu, les IR et l'induction de l'enzyme de restriction par 4-hydroxytamoxifène (4OHT) induisent la phosphorylation du marqueur de DSB, γ H2AX (Figure supp. 1A et 1B, bas). Cependant, la production de DSB dans ces deux systèmes n'induit pas l'expression de RND1 (Figures supp. 2A et 2B, haut).

Pour étudier dans notre système le rôle des DSB, nous avons inhibé leur production dans les cellules traitées par la CPT. A des concentrations inférieures à 1 μ M, les DSB sont

principalement produites lors de la réplication. Ainsi, l'inhibition de la réplication par l'aphidicoline, prévient l'induction de γ H2AX induite par la CPT (Figure supp. 2C, bas). Dans ces conditions, l'aphidicoline ne prévient pas l'induction de RND1 par la CPT (Figure supp. 2C, haut).

Ainsi, ces résultats semblent indiquer que l'induction de RND1 par la CPT n'est pas directement liée à la production de DSB.

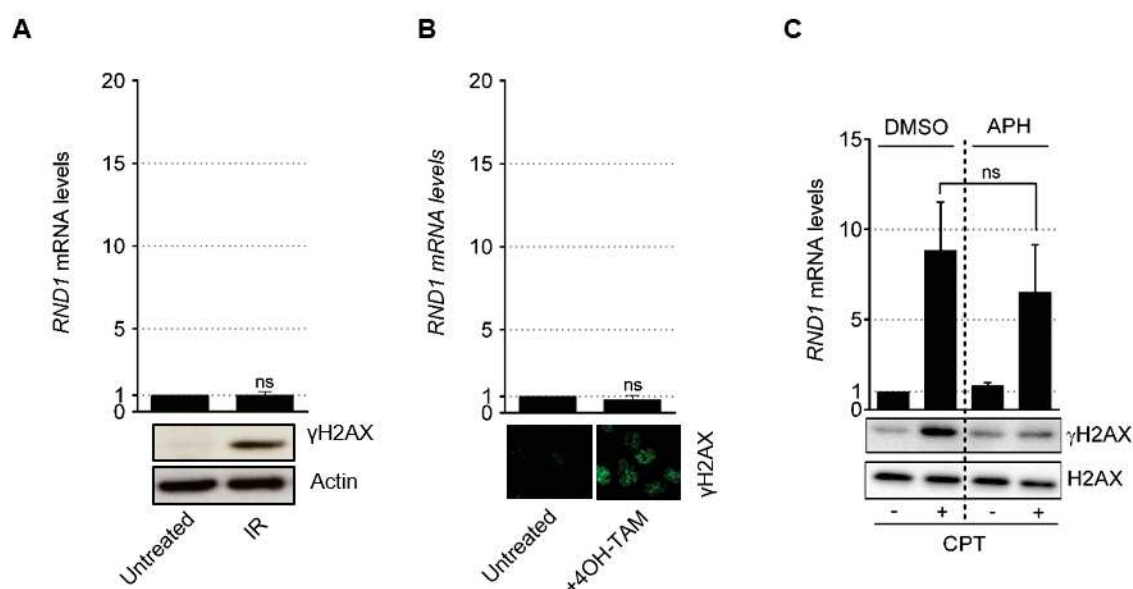


Figure supp. 2. L'induction de RND1 par la CPT n'est pas directement due à la production de DSB. (A) Les cellules U2OS sont irradiées par les radiations ionisantes (IR) à la dose de 6 Gy. Le taux d'ARNm de RND1 est analysé par RT-PCRq (A haut). Les données montrées représentent les moyennes $\pm$ SD de trois expériences indépendantes. ns = non significatif par *t* test. En parallèle, les expressions de H2AX et de sa forme phosphorylée en Ser139, γ H2AX, ont été analysées par western blot (A bas). (B) Les cellules U2OS EV28, exprimant de façon stable une enzyme de restriction fusionnée au récepteur modifié des œstrogènes (AsiSI-ER), qui génère des DSB après induction par le 4-hydroxytamoxifène (4 OH-TAM), ont été traitées par le DMSO (Untreated) ou par 4OH-TAM (300 nM, 4 h). L'expression de RND1 a été analysée par RT-qPCR (B haut). Les données montrées représentent les moyennes $\pm$ SD de trois expériences indépendantes. ns = non significatif par *t* test. En parallèle, les expressions de H2AX et de γ H2AX ont été analysées par immunofluorescence (B bas). (C) L'expression de RND1 a été analysée par RT-qPCR dans les cellules U2OS traitées par l'inhibiteur de réplication, l'aphidicoline (APH) (1 μ M, 15 min) avant l'ajout de CPT (1 μ M, 2 h). Les données montrées représentent les moyennes $\pm$ SD de cinq expériences indépendantes. ns = non significatif par one way ANOVA (C haut). En parallèle, les expressions de H2AX et de γ H2AX ont été analysées par western blot (C bas).

b) Quel est l'effet de l'inhibition de l'expression de la Top1 sur l'expression de RND1 ?

Nous avons souhaité étudier l'effet de l'inhibition de la Top1 dans les cellules U2OS et WI38 hTERT sur l'expression de RND1. Dans les deux lignées, l'inhibition de Top1 par siRNA n'a pas d'effet sur l'expression de RND1 (Figure supp. 3). Ce résultat confirme qu'en l'absence de Top1cc, il n'y a pas d'induction de RND1.

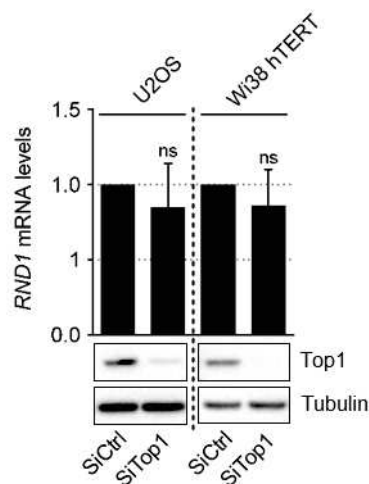


Figure supp. 3. L'inhibition de Top1 n'a pas d'effet sur l'expression de RND1. Les cellules U2OS et WI38 ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre la Top1 (siTop1) ou avec un siRNA contrôle (siCtrl). L'expression de RND1 a été analysée par RT-qPCR dans ces lignées (haut). Les données montrées représentent les moyennes $\pm$ SD de trois expériences indépendantes. ns = non significatif par *t* test. En parallèle, les expressions de la Top1 et de la tubuline ont été analysées par western blot (bas).

3) Quel est l'effet de l'inhibition des trois kinases clés de la DDR, ATM, ATR et DNA-PK, sur l'induction de RND1, en présence ou non de CPT ?

L'expression de RND1 est régulée par PARP1 qui intervient dans la réparation des DSB. Les kinases ATM, ATR et DNA-PK initient la DDR en reconnaissant la DSB (Blackford and Jackson, 2017). Récemment, des inhibiteurs spécifiques de chaque kinase ont été développés et sont actuellement en essai clinique de phase I ou II dans le traitement des cancers solides en monothérapie ou en association aux chimiothérapies classiques ou à la radiothérapie (Brown et al., 2017). Dans les cellules U2OS, l'inhibiteur d'ATM (ATMi) ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de RND1, tandis que l'inhibiteur d'ATR (ATRi) semble induire faiblement RND1, en présence ou non de CPT (Figure supp. 4). L'inhibiteur de DNA-PK (DNAPKi), affectant principalement la réparation par c-NHEJ, induit l'ARNm de RND1 d'un facteur 7 (Figure supp. 4). En association avec la CPT, l'inhibition de DNA-PK augmentent ses effets sur l'induction de RND1 (Figure supp. 4). L'inhibition de DNA-PK, et non d'ATM et d'ATR, entraîne une augmentation de l'expression de RND1, ce qui suggère un rôle de cette protéine dans le contrôle de l'expression de RND1.

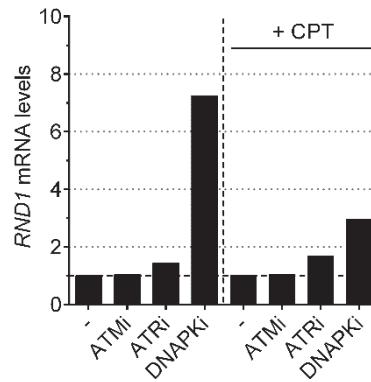


Figure supp. 4. L'expression de RND1 est induite par l'inhibition de DNA-PK. Les cellules U2OS sont traitées par le DMSO ou prétraitées pendant 1 heure par 10 μ M d'ATMi (KU55933), ATRi (VE-821) ou DNA-PKi (NU 7441) avant l'ajout de CPT (25 μ M, 2 h). L'expression de RND1 a été analysée par RT-qPCR. Pour les cellules traitées par la CPT (+CPT), le taux d'ARNm de RND1 est normalisé par rapport à la condition traitée uniquement par la CPT. ATMi, ATRi : N=1, DNAPKi : N=2.

4) Recherche de facteurs régulant l'expression de RND1 sous CPT

Au cours de ma thèse, avant d'avoir identifié l'implication de PARP1 dans le contrôle de l'expression de RND1, nous nous sommes intéressés au rôle potentiel du système ubiquitine/protéasome et du facteur p53 dans l'induction de RND1.

a) L'expression de RND1 est-elle contrôlée par le système ubiquitine/protéasome ?

Le système ubiquitine/protéasome régule la transcription des gènes notamment en contrôlant la liaison des activateurs et co-activateurs au niveau du promoteur, l'élongation, la terminaison ou encore la modifications des histones (Geng et al., 2012).

Afin de déterminer si l'expression de RND1 est contrôlée par le protéasome, nous avons testé l'effet de trois inhibiteurs du système ubiquitine/protéasome (MG132, Bortézomib : ciblent le protéasome, G5 : cible l'ubiquitine) sur le taux d'ARNm de RND1 dans ces cellules WI38 hTERT proliférantes (10% SVF) ou quiescentes (0.2% SVF), en présence ou non de CPT. Dans les cellules WI38 hTERT proliférantes, les inhibiteurs du protéasome induisent une augmentation de l'ARNm de RND1 (Figure supp. 5). Dans le modèle de cellules quiescentes, il semblerait que l'induction de RND1 par l'inhibition du protéasome soit retrouvée à un plus faible niveau (Figure supp. 5). Ainsi, il semblerait que l'expression de RND1 soit réprimée par le protéasome à l'état de base et qu'elle dépende de l'état de prolifération des cellules (Figure supp. 5).

Dans les cellules proliférantes et quiescentes, l'inhibition du protéasome augmente l'induction de RND1 par la CPT (Figure supp. 5).

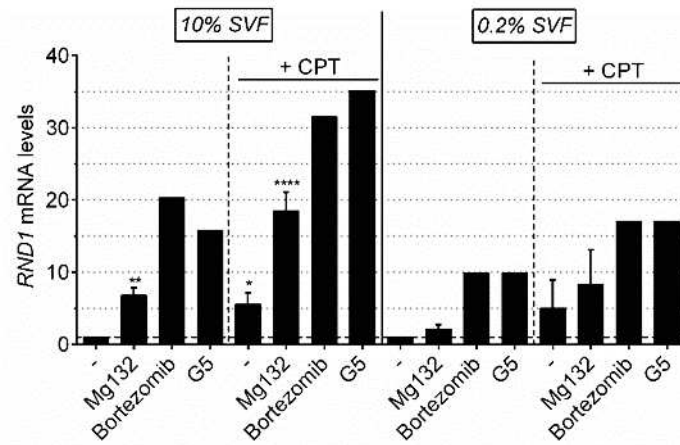


Figure supp. 5. L'expression de RND1 est réprimée par le protéasome et dépend de l'état de prolifération des cellules. Les cellules WI38 hTERT proliférantes (10 % SVF) ou quiescentes (0.2 % SVF) sont prétraitées ou non par les inhibiteurs du protéasome, le Mg132 (10 μ M, 1h), le bortézomib (1 μ M, 4 h), le G5 (1.5 μ M, 30 min), avant l'ajout de CPT (25 μ M, 2 h). L'expression de RND1 a été analysée par RT-qPCR. CPT, Mg132 : N=3 moyennes $\pm$ SD. Bortézomib, G5 : N = 1.

b) L'induction de RND1 par la CPT est-elle régulée par p53 ?

Le taux de protéines p53 augmente rapidement à partir d'un certain seuil de concentration de CPT, ce qui entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 (Jaks et al., 2001). L'expression de RND3, qui possède la plus grande homologie de séquence avec RND1, est augmentée par p53 (Ongusaha et al., 2006).

Afin de déterminer si l'induction de RND1 par la CPT est dépendante p53, nous avons étudié l'expression de RND1, en réponse à la CPT, dans des cellules HCT116 déficientes pour le gène P53 (HCT116 p53^{-/-}) et des cellules proficientes pour p53 (HCT116 p53^{+/+}). Nous n'avons pas observé de différence significative dans l'induction de RND1 par la CPT entre les deux lignées (Figure supp. 6). Il semblerait donc que l'induction de RND1 par la CPT soit indépendante de p53.

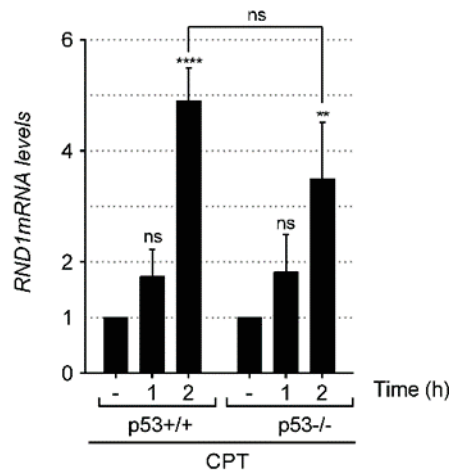


Figure supp. 6. L'induction de RND1 par la CPT est indépendante de p53. Les cellules HCT116 p53+/+ et HCT116 p53-/- sont traitées par 25 μ M de CPT pour les temps indiqués. L'expression de RND1 a été analysée par RT-qPCR. Les données montrées représentent les moyennes $\pm$ SD de trois expériences indépendantes. ns = non significatif, **P<0.01, ****P<0.0001 par one-way ANOVA.

5) Quel est l'effet de l'inhibition de l'expression de PARP1 sur l'expression de RND1 ?

Dans les cellules U2OS, nous avons observé que l'inhibition catalytique de PARP1 par le véliparib diminue l'expression de RND1. Il a été montré que la substitution de l'histone H1 par PARP1 inactive entraîne une conformation de la chromatine sous forme inactive mais moins condensée (Kim, 2004). L'absence de PARP1 sur la chromatine entraîne une chromatine inactive très compactée. Afin de déterminer si l'expression de PARP1 peut également contrôler l'expression de RND1, nous avons inhibé l'expression de PARP1 par siRNA et étudié par RT-PCR l'expression de RND1. L'inhibition de PARP1 par siRNA réduit l'expression de RND1 de 80% dans les cellules U2OS (Figure supp. 7), ce qui suggère que l'expression de PARP1 contrôle l'expression de RND1.

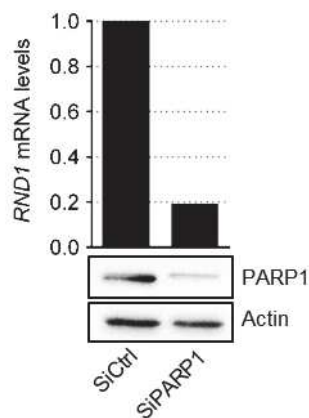


Figure supp 7. L'inhibition de PARP1 inhibe l'expression de RND1. Les cellules U2OS ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre la PARP1 (siPARP1) ou avec un siRNA contrôle (siCtrl). L'expression de RND1 a été analysée par RT-qPCR (haut). En parallèle, les expressions de la PARP1 et de la tubuline ont été analysées par western blot (bas). N=1

6) Le miR-199a-5p, identifié pour inhiber l'expression de RND1, est-il régulé par la CPT ?

Nous avons montré que la CPT augmente la demi-vie de RND1. La CPT inhibe la transcription de certains miR (Veloso et al., 2013). La partie 3'UTR de l'ARNm de RND1 possède un ou plusieurs sites spécifiques de liaison pour le miR-199a-5p. L'expression de ce miR entraîne la diminution de celle de RND1 (Monastyrskaya et al., 2013). Afin d'étudier si le miR-199a-5p était régulé par la CPT, nous avons étudié son expression en réponse à la CPT. Dans les cellules U2OS, nous n'avons pas observé d'effet sur l'expression du miR-199a-5p en réponse à la CPT (Figure supp. 8). Ainsi, il semblerait que la CPT ne contrôle pas l'expression du miR-199a-5p.

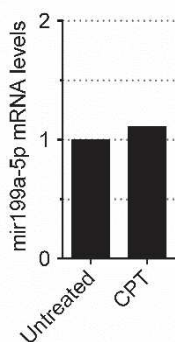


Figure supp. 8. La CPT n'a pas d'effet sur l'expression du miR-199a-5p. Les cellules U2OS sont traitées par le DMSO (Untreated) ou par la CPT (25 μ M, 2 h). L'expression de miR-199a-5p a été analysée par RT-qPCR. N=1

7) La surexpression de RND1 inhibe-t-elle l'apoptose induite par la CPT ?

Nous avons montré par l'analyse de marqueurs d'apoptose par Western Blot que la surexpression de RND1 protégeait les cellules U2OS de l'apoptose induite par la CPT. En réponse à la CPT, les cellules surexprimant RND1 présentent une diminution du pourcentage de cellules Annexine V/7-AAD par rapport aux cellules contrôles (Figure supp. 9), suggérant que RND1 inhibe l'apoptose tardive induite par la CPT.

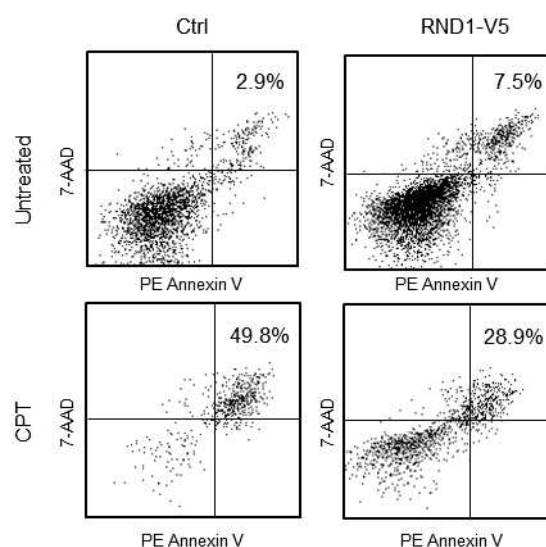


Figure sup. 9. La surexpression de RND1 inhibe l'apoptose tardive induite par la CPT. Les cellules U2OS ctrl et RND1-V5 sont traitées par le DMSO (Untreated) ou par la CPT (1 μ M, 72 h). L'apoptose a été analysée par cytométrie en flux après double marquage par Annexine V PE et 7-AAD. Le pourcentage de cellules en apoptose tardive est indiqué. N=1

8) L'expression de RND1 joue-t-elle sur la sensibilité à la CPT de lignées cellulaires autres que les cellules U2OS ?

A ce jour, en première ligne ou lors de rechute de patients atteints de glioblastome, trente neuf essais cliniques testent l'association de dérivés de la CPT à la radio-chimiothérapie standard (ClinicalTrials.gov, 2017). Nous avons testé l'effet de la surexpression de RND1 sur la sensibilité des cellules de glioblastome U87 à la CPT. Pour cela, nous avons transduit de manière stable des cellules U87 avec des particules virales contenant un plasmide qui porte l'ADNc de RND1 en fusion avec le tag V5 ou avec des particules virales contenant un plasmide contrôle. La surexpression de RND1 semble augmenter la résistance des cellules U87 à la CPT (Figure sup. 10A).

Nous avons ensuite testé le rôle de RND1 dans la sensibilité de différentes lignées cellulaires de cancers traitées par les dérivés de la CPT. A l'heure actuelle, en France, le topotécan est utilisé en monothérapie, dans le traitement du cancer du poumon à petites cellules (CPCC) chez les patients en rechute et pour lesquels la réintroduction de la première ligne de traitement n'est pas appropriée (ANSM, 2017). L'irinotécan est utilisé dans le traitement des cancers colorectaux avancés (ANSM, 2017). Pour tester l'effet de RND1 sur la sensibilité aux dérivés cliniques de la CPT, nous avons choisi la lignée de CPCC H460 et celle de cancer colorectal HCT116 en réponse au topotécan et à l'irinotécan respectivement et de les transfecter de façon transitoire par un plasmide portant l'ADNc de RND1 en fusion avec l'EGFP. Dans ces modèles, la surexpression de RND1 semble augmenter la résistance des

cellules H460 au topotécan mais n'a pas d'effet sur la sensibilité des cellules HCT116 à l'irinotécan (Figures supp. 10B et C). Ces résultats doivent être confirmés et étendus à d'autres lignées cellulaires de cancers pulmonaires ou colorectaux et suggèrent que RND1 participe à la sensibilité de cellules pour lesquelles une forte induction de RND1 par la CPT ou ses dérivés cliniques est observée (Figure supp. 1).

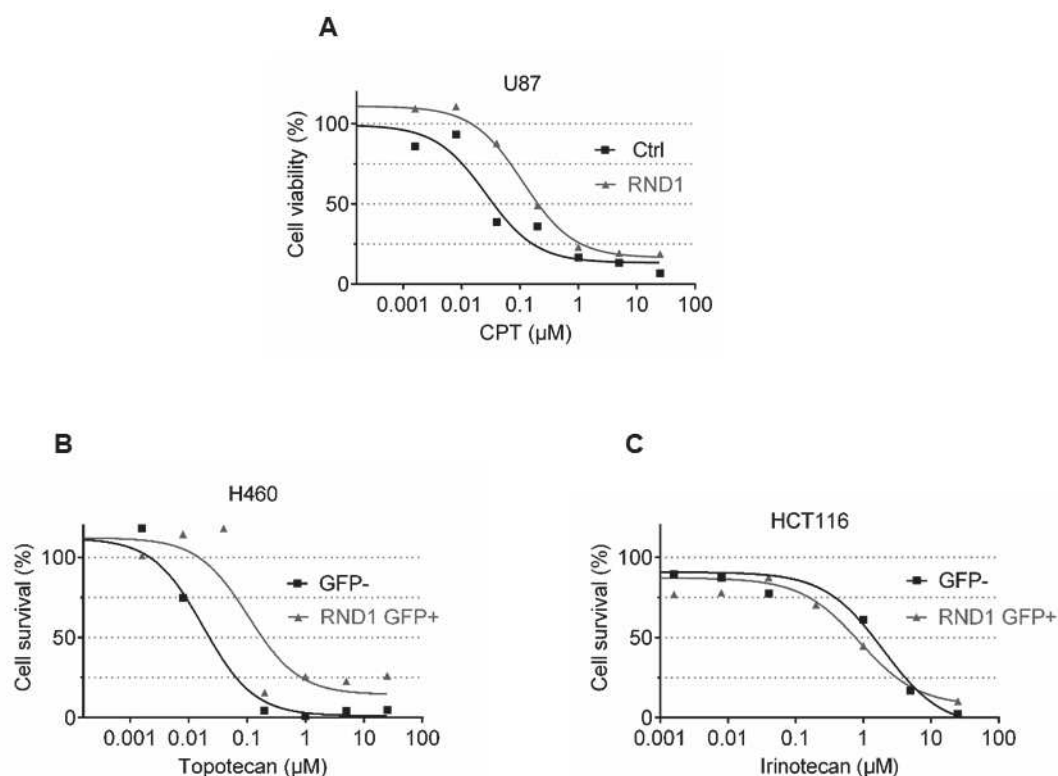


Figure supp. 10. La surexpression de RND1 augmente la résistance des cellules U87 et H460 aux CPT mais n'a pas d'effet sur les cellules HCT116. (A) 40 000 cellules U87 sont transduites avec une MOI égale à 5 par des particules virales contenant un plasmide qui porte l'ADNc de RND1 en fusion avec le tag V5 (RND1) et un gène de résistance à la puromycine ou avec des particules virales contenant un plasmide contrôle et un gène de résistance à la néomycine (ctrl). 3 jours après la transduction les cellules sont traitées par l'antibiotique correspondant. Les cellules stables U87 ctrl et U87 RND1 sont traitées par des doses croissantes de CPT (de 0.0016 μ M à 25 μ M). Soixante-douze heures après le traitement, la survie cellulaire est analysée par le test WST-1. N=1. (B et C) Les cellules H460 et HCT116 sont transfectées par le plasmide pEGFP-RND1. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules GFP- et GFP+ sont séparées par tri cellulaire. Les cellules H460 GFP- et RND1 GFP+ (B) et les cellules HCT116 GFP- et RND1 GFP+ (C) sont traitées respectivement par des doses croissantes de topotécan et d'irinotécan (de 0.0016 μ M à 25 μ M). Soixante-douze heures après le traitement, la survie cellulaire est analysée par le test WST-1. B : Donnée représentative de deux expériences indépendantes. C : N=1

9) RND1 joue-t-elle sur le nombre de foyers de DSB en réponse à la CPT ?

RND1 joue sur la sensibilité des cellules U2OS à la CPT. La résistance cellulaire à la CPT peut être due à différents mécanismes cellulaires incluant une surexpression des protéines d'efflux, une augmentation de la réparation de l'ADN et une diminution de l'apoptose (Beretta et al., 2013). Nous avons souhaité étudier l'implication éventuelle de RND1 dans la réparation des DSB. Pour répondre à cette question, nous avons analysé le nombre de foyers de DSB, par co-marquage de γ H2AX et 53BP1 par immunofluorescence, dans des cellules déficientes ou proficientes pour RND1. L'inhibition de RND1 dans des cellules U2OS n'augmente pas la formation de DSB à l'état de base (Figure supp. 11A et B). Ainsi, l'inhibition de RND1 dans ces cellules ne semble pas induire d'instabilité génomique. De plus, l'inhibition de RND1 n'augmente pas le taux de foyers de DSB induit par la CPT (Figure supp. 11A et B). Ce résultat suggère que RND1 n'est pas impliquée dans la réparation des dommages induits par la CPT.

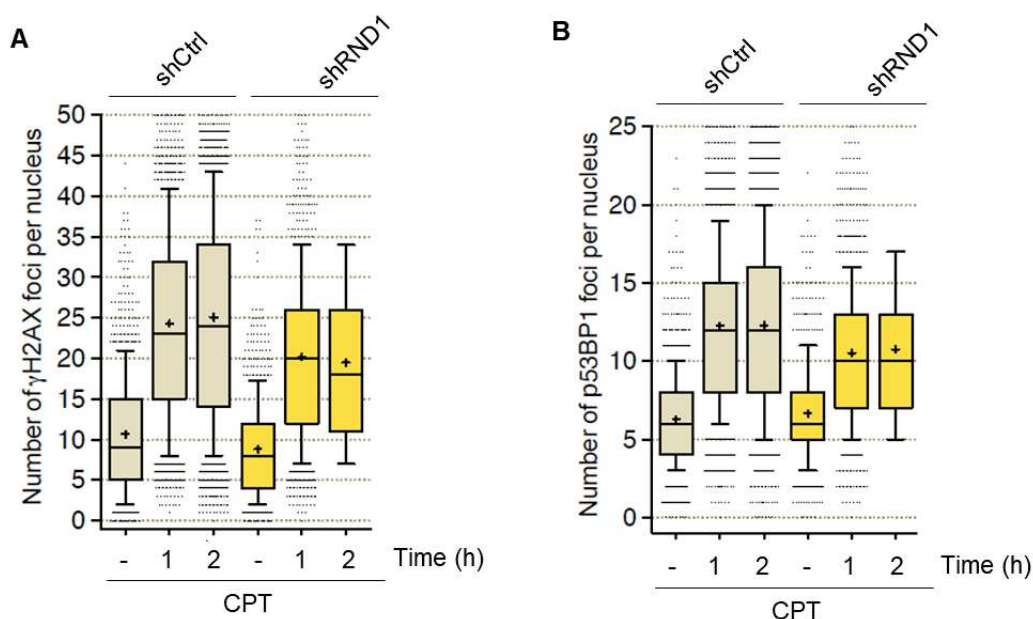


Figure supp. 11. L'inhibition de RND1 n'augmente pas le nombre de foyers de DSB ni à l'état de base, ni en réponse à la CPT. (A et B) 40 000 cellules U2OS sont transduites avec une MOI égale à 5 par des particules virales contenant un plasmide qui porte un shARN dirigé contre RND1 (shRnd1) et un gène de résistance à la néomycine ou avec des particules virales contenant un plasmide qui porte un shRNA contrôle et un gène de résistance à la puromycine (shCtrl). 3 jours après la transduction les cellules sont traitées par la néomycine. Les cellules stables shCtrl et shRND1 sont traitées pendant 1h ou 2h par le DMSO (untreated) ou par 1 μ M de CPT, puis ont été co-marquées pour γ H2AX et 53BP1. Les graphes correspondent au nombre de foyer de γ H2AX (A) et de 53BP1 (B) par noyau. Données représentatives de deux expériences indépendantes.

10) L'expression de RND1 est-elle induite par les inhibiteurs de Top2 ?

Au cours de mon travail de thèse, j'ai pu montrer que RND1 était induit par la stabilisation des Top1cc en réponse à la CPT. Nous avons également étudié si la production de complexes de clivage induits par la Top2 (Top2cc) augmentait également l'expression en ARNm de RND1.

Il existe deux grandes familles d'inhibiteurs de Top2: les poisons et les inhibiteurs catalytiques (Nitiss, 2009). Parmi les poisons, l'étoposide stabilise Top2cc et empêche la religation de l'ADN. Dans la famille des inhibiteurs catalytiques, l'ICRF-193 agit en bloquant l'enzyme sous forme inactive sur la chromatine. Contrairement aux poisons, les inhibiteurs catalytiques n'induisent pas de DSB. La stabilisation des Top2cc par l'étoposide induit l'expression de RND1 (Figure supp. 12A). Le traitement des cellules U2OS par l'ICRF-193 n'a pas d'effet significatif sur le taux d'ARNm de RND1 (Figure supp. 12B). Ce résultat suggère que l'inhibition seule de l'activité catalytique de la Top2 n'est responsable de l'induction de RND1. De plus, le pré-traitement des cellules U2OS par l'ICRF-193 prévient l'induction du taux d'ARNm RND1 par l'étoposide. Il semblerait donc que la formation des Top2cc puisse également induire RND1.

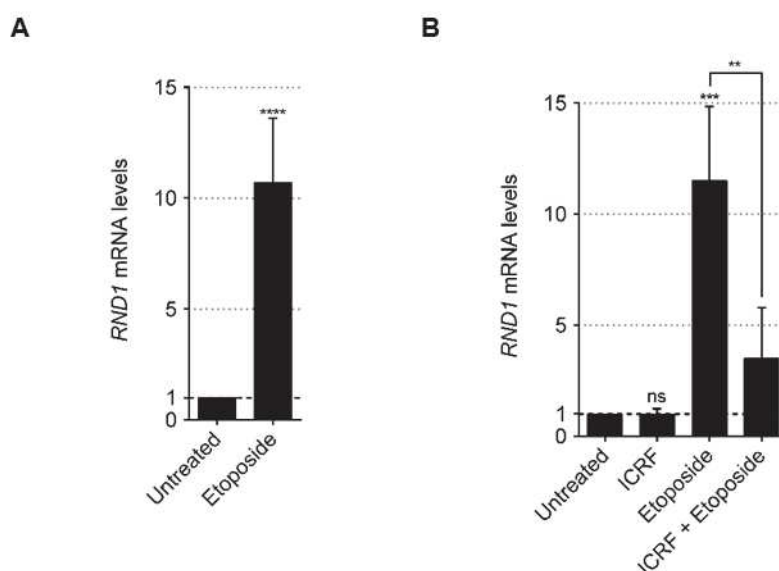


Figure supp. 12. L'expression de RND1 est induite par l'étoposide. (A) Les cellules U2OS sont traitées par le DMSO (Untreated) ou par le poison de topoisomérase II (Top2), l'étoposide (100 μ M, 2 h). L'expression de RND1 a été analysée par RT-qPCR. Les données montrées représentent les moyennes $\pm$ SD de six expériences indépendantes. **** $P < 0.0001$ par t test. (B) Les cellules U2OS sont traitées par le DMSO ou traitées pendant 3 heures ou prétraitées pendant 1 heure par l'inhibiteur catalytique Top2, ICRF-193 (50 μ M), avant l'ajout d'étoposide (100 μ M, 2 h). L'expression de RND1 a été analysée par RT-qPCR. Les données montrées représentent les moyennes $\pm$ SD de trois expériences indépendantes. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ par one way ANOVA.

11) La surexpression de RND1 joue-t-elle sur la sensibilité des cellules U2OS à l'étoposide ?

Pour étudier si l'augmentation d'expression de RND1 en réponse à l'étoposide avait un rôle dans la réponse cellulaire à l'étoposide, nous avons transfecté de manière transitoire des cellules U2OS par un plasmide portant l'ADNc de RND1 en fusion avec l'EGFP. La surexpression de RND1 dans les cellules U2OS semble augmenter leur résistance à l'étoposide (Figure supp. 13). Ce résultat suggère que RND1 pourrait être impliquée dans les mécanismes de résistance en réponse à différents génotoxiques.

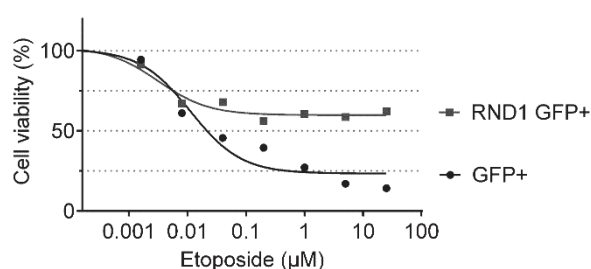


Figure supp. 13. La surexpression de RND1 augmente la résistance des cellules U2OS à l'étoposide. Les cellules U2OS sont transfectées avec le plasmide pEGFP-RND1. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules GFP- et GFP+ sont séparées par tri cellulaire. Les cellules U2OS GFP- et RND1 GFP+ sont traitées par des doses croissantes d'étoposide (de 0.0016 μM à 25 μM). Soixante-douze heures après le traitement, la survie cellulaire est analysée par le test WST-1. N=1

12) Existe-t-il une corrélation entre l'expression de RND1 et la sensibilité de lignées tumorales aux dérivés cliniques de la CPT ?

Pour déterminer s'il existe une corrélation entre l'expression de RND1 et la sensibilité de lignées tumorales aux dérivés cliniques de la CPT, nous avons collaboré avec Julia Gilhodes et Thomas Filleron, biostatisticiens à l'IUCT (Institut Universitaire du Cancer de Toulouse) qui ont analysé la base de données CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia) (Barretina et al., 2012). Cette base de données comporte des courbes de cytotoxicité pour 491 lignées tumorales et 24 agents utilisés en thérapeutique anticancéreuse dont le topotecan et l'irinotecan. Il n'y a pas de corrélation entre l'expression de RND1 et la sensibilité au topotecan ou à l'irinotecan des lignées tumorales (Tableau supp. 1).

Tableau supp. 1. Absence de corrélation entre l'expression de RND1 et la sensibilité de lignées tumorales aux dérivés de la CPT

Irinotecan							
Localisation tumorale	GA	Os	Sein	SNC	Endomètre	THL	Rein
Nombre de lignées tumorales	3	9	16	20	13	51	7
Coefficient de corrélation	nd	0.4833	0,0882	0,2	0,0989	0,1142	0,0714
p value	nd	0.1875	0,7452	0,3979	0,7479	0,4249	0,879
Topotecan							
Localisation tumorale	GA	Os	Sein	SNC	Endomètre	THL	Rein
Nombre de lignées tumorales	10	11	29	29	20	71	9
Coefficient de corrélation	-0,0303	0,5091	-0,0192	0,2158	-0,2767	-0,1096	0,1
p value	0,9338	0,1097	0,9212	0,261	0,2376	0,3631	0,798

Irinotecan						
Localisation tumorale	Gros intestin	Foie	Poumon	Œsophage	Ovaire	Pancréas
Nombre de lignées tumorales	13	11	45	5	23	19
Coefficient de corrélation	0,0989	-0,2273	0,0495	nd	-0.2302	-0.1404
p value	0,7479	0,5015	0,7466	nd	0.2906	0.5666
Topotecan						
Localisation tumorale	Gros intestin	Foie	Poumon	Œsophage	Ovaire	Pancréas
Nombre de lignées tumorales	23	19	91	15	28	28
Coefficient de corrélation	-0,2767	-0,1035	0,0558	0.2929	-0.1226	-0.0553
p value	0,2012	0,6733	0,5996	0.2895	0.5342	0.7799

Irinotecan						
Localisation tumorale	Plèvre	Peau	Tissus mous	Estomac	VADS	Voies urinaires
Nombre de lignées tumorales	4	31	4	8	2	13
Coefficient de corrélation	nd	0.2806	nd	0.2619	nd	0.1538
p value	nd	0.1262	nd	0.5309	nd	0.6158
Topotecan						
Localisation tumorale	Plèvre	Peau	Tissus mous	Estomac	VADS	Voies urinaires
Nombre de lignées tumorales	7	40	12	18	7	14
Coefficient de corrélation	0.1786	0.1096	0.3147	0.0815	0.1429	0.0681
p value	0.7017	0.5009	0.3191	0.7478	0.7599	0.8170

Nd= non déterminé. Le coefficient de corrélation est celui de Spearman.

GA : ganglions autonomes, SNC : système nerveux central, TGL : tissus hématopoïétiques et lymphoïdes, VADS : voies aérodigestives supérieures

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis d'identifier RND1 en tant que nouvelle RhoGTPase dont l'expression est induite de façon précoce en réponse à la CPT. Ce travail nous amène à proposer le modèle décrit figure 47. Les Top1cc induits par la CPT activent PARP1 qui augmente la transcription de RND1, et augmente probablement le taux de protéine RND1. L'augmentation du taux d'ARNm de RND1 dans la cellule augmente l'expression de PARP1, ce qui suggère un rétrocontrôle positif. L'augmentation de RND1 dans la cellule les rend plus résistantes aux analogues de la CPT, probablement en les protégeant de l'apoptose.

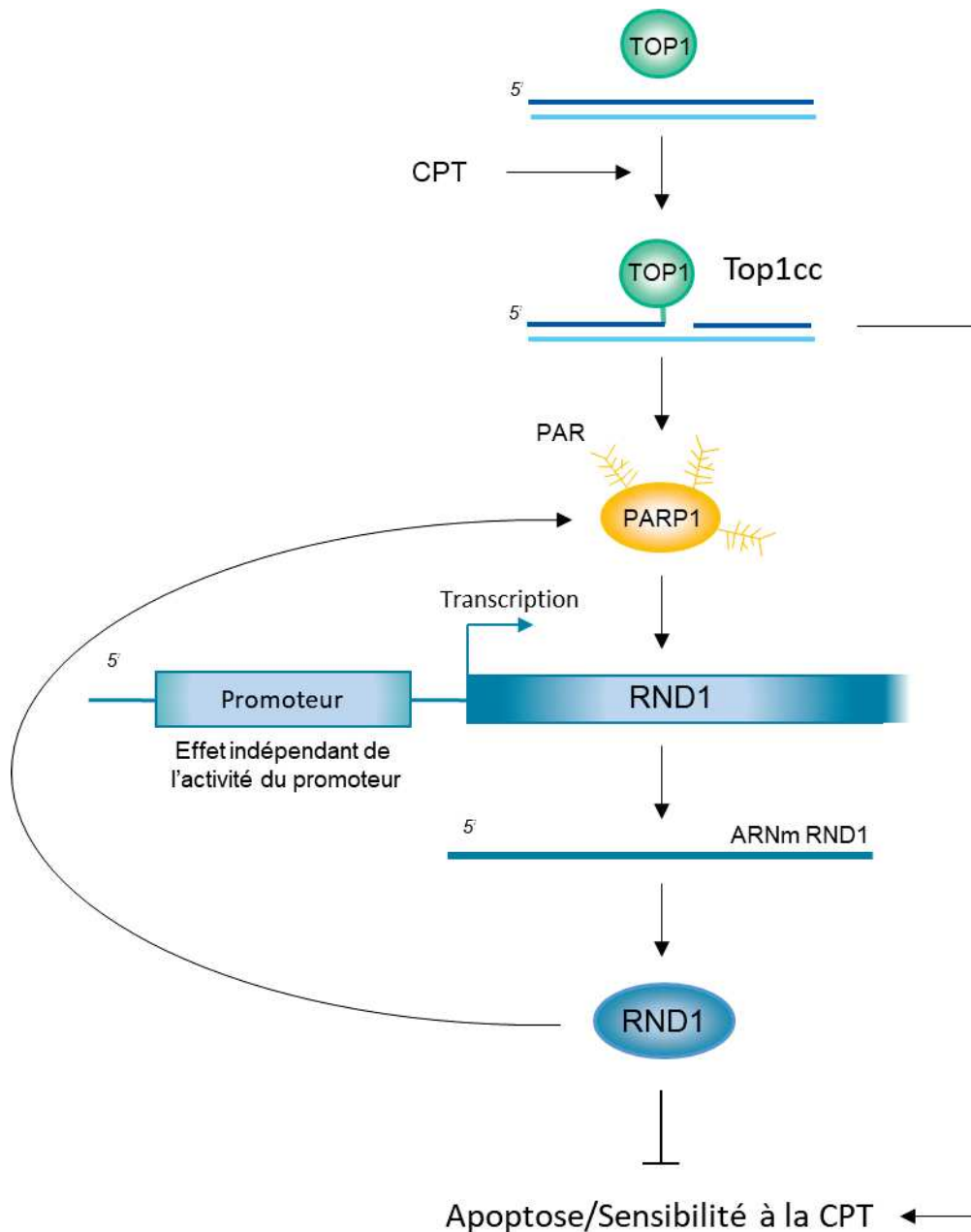


Figure 47 : Modèle proposé du rôle de RND1 dans la réponse cellulaire à la CPT

Dans cette partie, nous discuterons des principaux résultats de ce projet dans le contexte bibliographique actuel, des perspectives de ce travail et de la possibilité d'envisager RND1 comme nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des cancers en association aux dérivés solubles de la CPT.

1- Corrélation entre la stabilisation des Top1cc et l'induction de RND1

Plusieurs arguments sont en faveur de notre modèle (figure 47) où nous proposons que les Top1cc, et non les DSB, augmentent la transcription de RND1.

La CPT stabilise les complexes Top1cc qui peuvent facilement être convertis en DSB lors de la réplication (Hsiang et al., 1985; Hsiang et al., 1989a; Ryan et al., 1991) ou de la transcription (Cristini et al., 2016; Sordet et al., 2009). L'effet de la CPT sur la stabilisation des Top1ccs est réversible après retrait de la drogue (Goldwasser et al., 1996). Dans ce projet, nous montrons que la stabilisation des Top1cc par la CPT induit l'augmentation du taux d'ARNm de RND1 (Figure 2C de l'article) et de la transcription de RND1 (Figure 3A de l'article) et que la réversion des Top1cc suite au retrait de la CPT entraîne un retour à des niveaux de base du taux d'ARNm de RND1 (Figure 2C de l'article) et de la transcription de RND1 (Figure 3A de l'article). De nombreux travaux ont montré qu'en réponse à la CPT, le blocage de la réplication par l'aphidicoline prévient la conversion des Top1cc en DSB (Furuta et al., 2003; Holm et al., 1989; Ryan et al., 1991; Strumberg et al., 2000). Dans les cellules U2OS, nous avons observé que l'aphidicoline ne prévenait pas l'induction de RND1 par la CPT, suggérant que les DSB induites par la CPT ne sont pas à l'origine de l'induction de RND1 (Figure supp. 2C). Par ailleurs, il a été montré dans des neurones corticaux de souris, que le topotécan, et non la diminution d'expression de la Top1 par shRNA, augmentait l'expression de gènes courts (King et al., 2013), suggérant que l'augmentation de la transcription des gènes par le topotécan dépendait de son effet sur la stabilisation des Top1cc et non de l'inhibition de Top1. En accord avec cette observation, nous avons montré que la déplétion de Top1 n'avait pas d'effet sur l'expression de RND1 (Figure supp. 3). Ces différents résultats suggèrent qu'en réponse à la CPT, l'induction de RND1 résulterait de la stabilisation des Top1cc et non des DSB qu'elle génère, ni de l'inhibition de la Top1.

De nombreuses lésions de l'ADN endogènes ou exogènes survenant à proximité du site de clivage de la Top1, entraînent l'accumulation de Top1cc (Pourquier and Pommier, 2001).

De façon intéressante, nous avons observé que l'expression de RND1 était augmentée par les radiations UVB et par H₂O₂ (Figure 2A de l'article), deux agents capables indirectement de stabiliser les Top1cc dans les cellules (Daroui et al., 2004; Lanza et al., 1996; Subramanian et al., 1998). A l'inverse, les traitements n'exerçant pas d'effet sur les Top1cc ne modifient pas l'expression de RND1 (Figure 2B de l'article). Ainsi, nous pourrions émettre comme hypothèse que l'effet des UVB et de H₂O₂ sur l'induction de RND1 serait lié à leur capacité à former des Top1cc.

Toutefois, il est important de souligner que contrairement à la CPT, les UV et H₂O₂ ne ciblent pas directement la Top1 mais l'ADN. Ainsi, les radiations UVB forment principalement des dimères de pyrimidine tels que les dimères cyclobutyliques de pyrimidine et les photoproduits 6,4 (Lanza et al., 1996; Subramanian et al., 1998). H₂O₂ appartient à la famille des ROS (Reactive Oxygen Species) qui génèrent de nombreuses lésions de l'ADN dont principalement la modification de base 8-oxoG (7,8-dihydro-8-oxoguanine) (Daroui et al., 2004). De plus, ces deux types de dommages sont capables d'induire l'activation de PARP1 (Fujimoto et al., 2017; Jungmichel et al., 2013). Au cours de ce projet, nous avons mis en évidence que la PARylation régulait positivement l'induction de RND1. De ce fait, une autre hypothèse serait que l'augmentation de RND1 par ces deux agents dépende directement de la PARylation médiée par PARP1.

Afin d'éclaircir le mécanisme d'induction de RND1, il serait intéressant de déterminer si l'augmentation de RND1 par les radiations UVB et par H₂O₂ est lié à leur effet sur la stabilisation des Top1cc qui entraîne l'activation de PARP1. Pour cela, nous étudierons l'effet de H₂O₂ et des rayons UVB sur l'expression de RND1 dans des cellules où la Top1 aura préalablement été inhibée par shRNA ou siRNA ou dans des cellules où la Top1 est mutée et ne peut pas former de Top1cc en réponse à la CPT.

2- Comment la CPT peut-elle augmenter la transcription de RND1 ?

Par la méthode du click-it marquant les ARN nouvellement transcrits, nous avons mis en évidence l'augmentation transcriptionnelle de RND1 par la CPT (Figure 3A de l'article). L'effet de la CPT sur la transcription de RND1 est rapidement réversé après le retrait de la molécule (Figure 3A de l'article), suggérant une régulation étroite de la transcription de RND1 dans la cellule.

Différents travaux ont montré que la CPT inhibe rapidement le taux global de transcription des ARNm (Cristini et al., 2016; Desai et al., 2003). Cependant de nombreuses

études ont mis en évidence que la CPT affectait différemment l'expression génique (King et al., 2013; Lotito et al., 2009; Solier et al., 2013; Veloso et al., 2013; Zhou et al., 2002). En effet, même si la CPT diminue majoritairement l'expression des gènes, elle est également capable d'augmenter la transcription de certains.

Des analyses transcriptomiques ont permis d'identifier les caractéristiques des gènes régulés positivement par les Top1cc (King et al., 2013; Solier et al., 2013; Veloso et al., 2013). Les gènes courts sont induits préférentiellement par la CPT ou ses analogues, par rapport aux gènes longs (King et al., 2013; Solier et al., 2013; Veloso et al., 2013). Solier et al. ont identifié que la longueur moyenne des gènes inhibés par la CPT était de 66 kb, alors que celle des gènes augmentés était de 7 kb (Solier et al., 2013). Dans l'étude de Veloso et al., il a été rapporté que la longueur moyenne des gènes dont la transcription est inhibée par la CPT est de 136,4 kb, tandis que celle des gènes hautement transcrits par la CPT est de 8,9 kb (Veloso et al., 2013). De plus, les gènes inhibés par la CPT possèdent en moyenne quatorze exons alors que ceux augmentés en possèdent en moyenne quatre (Solier et al., 2013). Le gène RND1 possède une longueur de 8,737 kb et est constitué de cinq exons (NCBI), ce qui correspond donc aux caractéristiques des gènes préférentiellement transcrits par la CPT. Par ailleurs, il a été mis en évidence que la CPT augmente généralement la transcription des gènes peu exprimés (Solier et al., 2013). Dans ce projet, nous avons observé que le taux d'ARNm de RND1, à l'état basal, était relativement faible dans les différents modèles cellulaires utilisés, murins ou humains, tumorigènes ou immortalisés (Données non montrées). Dans la littérature, il a été décrit que RND1 était un gène plutôt faiblement exprimé dans la plupart des tissus chez l'adulte à l'exception du cerveau et du foie (Nobes, 1998). En outre, la CPT modifie la balance survie/apoptose en induisant généralement l'expression de gènes pro-apoptotiques courts et de gènes cibles de p53 (Veloso et al., 2013). Nos résultats divergent par rapport à ces dernières observations puisque nous avons montré que l'induction de RND1 par la CPT était indépendante de p53 (Figure supp. 6) et protégeait les cellules de l'apoptose induite par la CPT (Figures 6C, D et F de l'article).

Différentes études ont montré que l'inhibition de la transcription des gènes sous CPT était liée à l'effet de l'inhibition de la Top1 sur l'altération de l'élongation des ARNm (Capranico et al., 2010; King et al., 2013; Stewart et al., 1990). A ce jour, les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la transcription des gènes par la CPT sont peu connus. Deux études ont décrit comment un dérivé de la CPT pouvait réguler positivement l'expression du gène Ube3a en inhibant le lncRNA anti-sens Ube3a-ATS (Huang et al., 2011;

Powell et al., 2013). Les lncRNA sont des ARN longs, supérieurs à 200 nucléotides. Il existe différentes catégories de lncRNA dont les lncRNA intergéniques, les lncRNA introniques ou encore les lncRNA anti-sens. Les lncRNA anti-sens sont transcrits dans la direction opposée des gènes codants avec lesquels ils partagent des séquences complémentaires. Les lncRNA anti-sens répriment l'expression des gènes auxquels ils sont associés (Kung et al., 2013). L'inhibition de la Top1 par la CPT ou le topotécan diminue l'expression des lncRNA et pourrait par ce mécanisme induire la transcription de certains gènes (King et al., 2013; Veloso et al., 2013). Par exemple, le topotécan induit la réexpression du gène Ube3a en inhibant le lncRNA anti-sens Ube3a-ATS (Huang et al., 2011; Powell et al., 2013). Récemment, le lncRNA anti-sens AGAP2-AS1 a été identifié en tant que répresseur de l'expression de RND1 (Li et al., 2016; Qi et al., 2017). L'inhibition de l'expression d'AGAP2-AS1 par siRNA induit l'augmentation de l'ARNm de RND1 dans les cellules du cancer du poumon non à petites cellules H1975 et dans les cellules du cancer gastrique BGC823 (Li et al., 2016; Qi et al., 2017). Afin de vérifier si l'anti-sens AGAP2-AS1 participe à la régulation de RND1 par la CPT, nous pourrions étudier l'effet de la CPT sur l'expression d'AGAP2-AS1.

D'autres mécanismes pourraient être envisagés pour expliquer comment la CPT pourrait augmenter la transcription de certains gènes.

La CPT modifie la structure de la chromatine en inhibant la liaison de H1 à l'ADN et en augmentant l'acétylation des histones H3 et H4 (Khobta et al., 2006; Lotito et al., 2008). La modification des histones par la CPT permet la relaxation de la chromatine. Cependant, les effets de la Top1 sur la régulation transcriptionnelle des gènes sont différents selon la région impliquée. En effet, la CPT diminue l'expression des gènes H2AB et H3B en inhibant l'élongation de la transcription dans le corps des gènes (Khobta et al., 2006), tandis que l'inhibition de la Top1 augmente la transcription des gènes dans les régions sub-téломériques (Lotito et al., 2008). L'expression de RND1 est régulée par des mécanismes épigénétiques et notamment par l'acétylation des histones. Le co-traitement par l'inhibiteur de la méthylation de l'ADN le 5'AZA-2'Deoxycytidine, et l'inhibiteur des histone-désacétylases la TSA, augmente la transcription de RND1 (Figure 3B de l'article) (Nishigaki et al., 2005b; Okada et al., 2015). Ainsi en modifiant la structure de la chromatine via l'acétylation des histones, la CPT pourrait augmenter la transcription de RND1.

Les travaux de Lotito et al. ont montré que l'activation de la transcription par la CPT chez la levure était régulée par deux facteurs de transcription SWI4 et MBP1 (Lotito et al., 2009). SWI4 et MBP1 agissent, respectivement, en tant qu'activateur et répresseur de l'augmentation transcriptionnelle des gènes sous CPT. Parmi les vingt-deux gènes régulés

positivement par la CPT identifiés dans cette étude, dix-huit présentaient au niveau du promoteur le motif MCB (MluI-cell-cycle box) de séquence ACGCG correspondant au motif de liaison de SWI4 et MBP1 (Lotito et al., 2009). Chez l'homme, la protéine E2F serait l'homologue fonctionnel de Swi4 dans la régulation du cycle cellulaire (Miles et al., 2016; Wittenberg and Reed, 2005). Par analogie, il se pourrait qu'E2F soit impliquée dans l'effet transcriptionnel de la CPT dans les cellules humaines. Dans ce projet, nous avons montré que l'induction transcriptionnelle de RND1 par la CPT ne dépendait pas d'une augmentation de l'activité du promoteur minimal de RND1 (Figure 3B de l'article). Ces résultats nous indiquent que la transcription de RND1 par la CPT n'est vraisemblablement pas régulée par des mécanismes équivalents à SWI4/MBP1.

Dans ce projet, nous avons identifié un nouveau mécanisme de régulation de la transcription de RND1 par la CPT via la PARylation médiée par PARP1. PARP1 régule positivement la transcription d'un grand nombre de gènes (Frizzell et al., 2009; Ogino et al., 2007). Ainsi, en augmentant la PARylation, la CPT pourrait entraîner la transcription des gènes régulés par PARP1.

3- Comment la CPT peut-elle jouer sur la stabilité de l'ARNm de RND1 ?

Outre la régulation transcriptionnelle de RND1, nous avons mis en évidence que la CPT augmentait la stabilité de l'ARNm de RND1 (Figures 3C et D de l'article).

Une étude du laboratoire a montré que la CPT augmentait la stabilité de l'ARNm de RhoB par la protéine de liaison aux ARNm, HuR (Mamouni et al., 2014). Certaines protéines de liaison aux ARNm se lient au niveau de la région 3'UTR des ARNm et les régulent (Szostak and Gebauer, 2013). En réponse à la CPT, HuR se lie sur l'ARNm de RhoB et le stabilise (Mamouni et al., 2014). Afin d'étudier l'implication de HuR dans notre mécanisme, nous avons étudié la liaison de HuR sur l'ARNm de RND1 après traitement par la CPT par la méthode d'immunoprécipitation de l'ARN. Les premiers résultats nous indiquent que la CPT n'induit pas la liaison d'HuR sur l'ARNm de RND1 (Données non montrées). Ainsi, il ne semblerait pas que la protéine HuR soit impliquée dans la régulation de la stabilité de l'ARNm de RND1 par la CPT. Par ailleurs, il a récemment été montré que PARP1 induit la PARylation de HuR et stabilise certains ARNm (Ke et al., 2017). Néanmoins, nos résultats indiquent que la stabilisation de l'ARNm de RND1 n'est pas dépendante de PARP1 (Figure 4D de l'article)

D'autre part, la stabilisation des Top1cc peut induire la réexpression de gènes en inhibant la transcription de miR (Veloso et al., 2013). Les miR sont de courts ARN non codants qui s'apparient sur des ARNm généralement au niveau de leur région 3'UTR et entraîne leur dégradation ou l'inhibition de leur traduction (Jonas and Izaurralde, 2015). Les miR-199a-5p (Monastyrskaya et al., 2013) et miR-603 (Zhang et al., 2016) inhibent l'expression de RND1. Une première expérience préliminaire suggère que la CPT n'a pas d'effets sur l'expression du miR-199a-5p (Figure supp. 8). Toutefois, on ne peut pas exclure la possibilité que le miR-199a-5p soit impliqué dans le mécanisme de régulation de RND1 par la CPT. En effet, bien que la CPT ne semble pas réguler l'expression du miR-199a-5p, il se pourrait que la CPT induise le déplacement du miR de l'ARNm de RND1. Par exemple, il a été montré que RhoB était induit en réponse aux rayons UV via la libération concomitante du miR-19 et de HuR de l'ARNm de RhoB (Glorian et al., 2011).

4- Comment PARP1 peut-elle augmenter la transcription de RND1 ?

Dans ce projet, nous avons montré que la transcription de RND1 par la CPT dépend de l'activité de PARylation de PARP1 (Figures 4B et 4C de l'article).

Gibson et al. ont rapporté un enrichissement de la PARylation médiée par PARP1 au niveau des promoteurs des gènes transcriptionnellement actifs ainsi qu'à un plus faible niveau dans les régions enhancers et le corps des gènes actifs (Gibson et al., 2016). La régulation transcriptionnelle par PARP1 met en jeu différents mécanismes, notamment la modification de la structure et de la composition de la chromatine au niveau du promoteur des gènes. En effet, PARP1 en excluant l'histone H1 du promoteur (Krishnakumar et al., 2008), en PARylant les core histones (Martinez-Zamudio and Ha, 2012), en empêchant la déméthylation de l'histone H3K4me3 par un mécanisme dépendant de la PARylation (Krishnakumar and Kraus, 2010) facilite la décondensation de la chromatine et l'initiation de la transcription des gènes. Toutefois, nos résultats montrent que la CPT n'augmente pas l'activité luciférase qui est sous le contrôle du promoteur minimal de RND1 (Figure 3B de l'article). Ce résultat suggère que la régulation transcriptionnelle de RND1 par la CPT ne met pas en jeu l'action de PARP1 sur le promoteur minimal de RND1.

Une autre hypothèse serait que PARP1 induise la transcription de RND1 en augmentant l'activité de facteurs de transcription se liant à des régions enhancers en amont du promoteur du gène RND1. PARP1 régule l'expression de nombreux gènes, notamment ceux qui ont un rôle dans la régulation transcriptionnelle (Frizzell et al., 2009; Ogino et al., 2007). Par

exemple, il a été montré que dans les cellules PARP1^{-/-}, l'expression du gène hnRNPA1 (heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein A1) est inhibée (Ogino et al., 2007). Dans la littérature, hnRNPA1 a été identifié comme un activateur transcriptionnel et augmente la transcription de la cytokine pro-inflammatoire interleukine-6 (IL-6) en se liant sur la région distale en 5' du gène de l'IL-6 située entre -5 307 à -5 202 bp en amont du site d'initiation à la transcription (Zheng et al., 2013). Au cours de ce travail, nous avons montré que la CPT n'induit pas d'augmentation de l'activité luciférase sous le contrôle du promoteur de RND1 et d'une de deux régions enhancers de RND1 (Shen et al., 2014; Suehiro et al., 2014) (Figure 3B de l'article). D'autres régions enhancers en amont du promoteur de RND1, non explorées dans cette étude, pourraient être régulées par un mécanisme dépendant de PARP1 et induit par la CPT.

Une autre hypothèse serait que PARP1 induirait la transcription de RND1 via le corps du gène de RND1. En effet, il a été montré que PARP1 facilitait l'élongation productive de la transcription en induisant la libération de l'ARN pol II de son site de pause via la PARylation de NELF-E (Gibson et al., 2016). La CPT entraîne également la libération de l'ARN pol II en recrutant le facteur positif d'élongation de la transcription P-TEFb qui était séquestrée sous forme inactive au sein du complexe 7SK snRNP (Amente et al., 2009; Capranico et al., 2010). Même si les effets de PARP1 et de la CPT sur la régulation de l'étape de pause de l'ARN pol II font intervenir deux cibles distinctes, ces deux mécanismes pourraient être liés. En effet, la PARylation de NELF-E par PARP1 est dépendante de la phosphorylation de NELF par P-TEFb (Gibson et al., 2016). Ainsi, nous pouvons envisager qu'en augmentant la PARylation, la CPT renforcerait son effet sur la libération de l'ARN pol II et participerait à l'augmentation de l'élongation des gènes, dont celle de RND1.

Afin d'étudier la région du gène RND1 régulée par la CPT et PARP1, nous étudierons la liaison de l'ARN polymérase II, par la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine, au niveau de régions en amont du promoteur, à proximité de la région de la pause de l'ARN pol II, dans le corps du gène et la région 3' du gène RND1 dans des cellules U2OS traitées par la CPT et/ou le véliparib.

5- Localisation subcellulaire de RND1 et résistance cellulaire à la CPT

Dans ce projet, nous avons montré que l'inhibition de RND1 augmente l'apoptose induite par la CPT et sensibilise les cellules à la CPT (Figures 6 de l'article, figures supp. 9 et 10). Au sein de la cellule, RND1 est associée à la membrane plasmique sous forme active (Kato et al., 2002; Nobes et al., 1998; Wunnenberg-Stapleton et al., 1999) et séquestrée, sous forme phosphorylée, dans le cytoplasme lorsqu'elle interagit avec la protéine 14-3-3 (Riou, 2013). Nous souhaiterions déterminer si des modifications de la localisation subcellulaire de RND1 participent à la résistance des cellules à la CPT.

Une première hypothèse pour expliquer comment RND1 participe à la résistance cellulaire à la CPT serait que suite à un traitement par la CPT, RND1 reste localisée à la membrane plasmique et active une voie de signalisation qui joue sur la sensibilité des cellules à la CPT. Un argument en faveur de cette hypothèse repose sur RND3, l'homologue qui partage le plus d'identité avec RND1. Ainsi, une étude récente a montré que l'inhibition de RND3 augmente la chimiorésistance au cisplatine ou à la doxorubicine de lignées d'hépatocarcinome via l'activation de son effecteur ROCK2 et de la voie de signalisation anti-apoptotique NF- κ B/IL-6/ STAT3 (Ma et al., 2016).

Une deuxième hypothèse serait que la CPT provoque le déplacement de RND1 vers le noyau où RND1 diminuerait l'action de la CPT. En effet, d'autres Rho GTPases, comme Rac1, peuvent faire la navette entre la membrane plasmique et le noyau (Navarro-Lerida et al., 2015; Sandrock et al., 2010) et réguler l'activité de protéines nucléaires (Jamieson et al., 2015; Wartlick et al., 2013). De plus, en réponse à la doxorubicine (inhibiteur de Top2), Rac1 est exportée vers le noyau où il induit la phosphorylation de Top2, nécessaire à la signalisation des dommages induits par la doxorubicine (Wartlick et al., 2013). Nous ne savons pas si RND1 est présent dans le noyau des cellules à l'état de base ou en réponse à un stress. Néanmoins, la délétion de sa partie N-terminale ou l'inhibition de la farnésylation entraîne la diminution de RND1 à la membrane plasmique et l'accumulation de la protéine au niveau cytoplasmique et nucléaire (Oinuma et al., 2012; Roberts et al., 2008). De plus, il a été mis en évidence que RND3, membre le plus proche de RND1 en terme de séquence et de fonction, était présent dans le noyau de cellules de glioblastomes U87 (Clarke et al., 2015).

Afin de déterminer si la localisation subcellulaire de RND1 est nécessaire à son effet sur la sensibilité des cellules à la CPT, nous proposons d'inhiber sa liaison à la membrane

plasmique en inhibant la farnésylation avec un FTI ou en utilisant un mutant de RND1 sans son domaine farnésyl ou CAAX, nécessaires à sa localisation à la membrane plasmique, et d'étudier l'effet sur la sensibilité à la CPT.

6- RND1, potentielle cible thérapeutique dans les tumeurs traitées par les analogues de la CPT ?

Les analogues de la CPT, l'irinotécan et le topotécan, sont utilisés en clinique dans les traitements des cancers colorectaux ainsi que dans les traitements des carcinomes métastatiques de l'ovaire, des cancers du poumon à petites cellules et des carcinomes du col de l'utérus respectivement (ANSM, 2017). Cependant, le rapport bénéfice/risque de ces molécules est faible et peu de patients répondent au traitement. Par exemple, dans la totalité des études sur le cancer de l'ovaire traité par le topotécan (n = 392), le taux de réponse était seulement de 16 % (ANSM, 2017). Ce faible taux de réponse est dû aux mécanismes de résistance aux analogues de la CPT. Parmi ces résistances, il faut distinguer celles qui visent la Top1 (diminution de l'expression de Top1, diminution des Top1cc...) et les mécanismes de résistance généraux qui limitent l'accès de la CPT à sa cible comme la surexpression des transporteurs d'efflux (Klejewski et al., 2017). Il est important d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques afin de lutter contre ces résistances et améliorer la prise en charge des patients.

Au cours de nos travaux, nous avons montré que l'inhibition de RND1 sensibilisait les cellules U2OS à la CPT (Figures 6A et 6B de l'article) et que la surexpression de RND1 dans les cellules U2OS, U87 et H460 entraînait une résistance de ces cellules à la CPT ou à un de ses analogues, le topotécan (Figure 6E de l'article et figure supp. 10). Nos résultats mettent en évidence que RND1 est impliqué dans les voies favorisant la survie cellulaire et suggèrent que RND1 constituerait une cible thérapeutique intéressante à inhiber notamment dans les cancers du poumon à petites cellules traitées par le topotécan.

Néanmoins, l'inhibition de RND1 dans des cellules mammaires non-tumorigènes initie la tumorigenèse mammaire et entraîne une transition épithélio-mésenchymateuse (Okada et al., 2015). De plus, la surexpression de RND1 dans des cellules tumorales mammaires cause un retard de la croissance tumorale primaire et une diminution de la formation de métastases pulmonaires (Okada et al., 2015). Par ailleurs, en collaboration avec l'équipe du Pr Moyal, nous avons montré que l'inhibition de RND1 dans des cellules souches de glioblastome augmente les capacités invasives de ces cellules (Cf article 2). De plus, la sous-expression de

RND1 chez les patients atteints de glioblastome est associée à un mauvais pronostic vital (Cf article 2). A la lumière de ces données, cibler directement la protéine RND1 ne semble pas envisageable. La stratégie thérapeutique consisterait à cibler une protéine située en aval de la signalisation activée par RND1 en réponse à la CPT.

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'identifier un mécanisme de régulation transcriptionnelle du gène RND1 en réponse à la CPT via l'induction de la PARylation médiée par PARP1, qui pourrait constituer un mécanisme général de régulation positive de la transcription génique par la CPT. De plus, cette étude a mis en lumière une nouvelle fonction de RND1, dans les voies favorisant la survie cellulaire. Elle suggère que RND1 pourrait être une nouvelle cible thérapeutique d'intérêt dans la sensibilisation aux analogues de la CPT utilisées dans les thérapies anticancéreuses.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdurashidova, G., Radulescu, S., Sandoval, O., Zahariev, S., Danailov, M.B., Demidovich, A., Santamaria, L., Biamonti, G., Riva, S., and Falaschi, A. (2007). Functional interactions of DNA topoisomerases with a human replication origin. *The EMBO journal* **26**, 998-1009.
- Adachi, N., So, S., and Koyama, H. (2004). Loss of nonhomologous end joining confers camptothecin resistance in DT40 cells. Implications for the repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *The Journal of biological chemistry* **279**, 37343-37348.
- Adamietz, P., and Rudolph, A. (1984). ADP-ribosylation of nuclear proteins in vivo. Identification of histone H2B as a major acceptor for mono- and poly(ADP-ribose) in dimethyl sulfate-treated hepatoma AH 7974 cells. *The Journal of biological chemistry* **259**, 6841-6846.
- Adams, D.J., Wahl, M.L., Flowers, J.L., Sen, B., Colvin, M., Dewhirst, M.W., Manikumar, G., and Wani, M.C. (2006). Camptothecin analogs with enhanced activity against human breast cancer cells. II. Impact of the tumor pH gradient. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **57**, 145-154.
- Adelman, K., and Lis, J.T. (2012). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nature reviews Genetics* **13**, 720-731.
- Ader, I., Delmas, C., Bonnet, J., Rochaix, P., Favre, G., Toulas, C., and Cohen-Jonathan-Moyal, E. (2003). Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts. *Oncogene* **22**, 8861-8869.
- Ader, I., Toulas, C., Dalenc, F., Delmas, C., Bonnet, J., Cohen-Jonathan, E., and Favre, G. (2002). RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death. *Oncogene* **21**, 5998-6006.
- 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. *The Journal of biological chemistry* **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.
- Aguirre, A.J., Brennan, C., Bailey, G., Sinha, R., Feng, B., Leo, C., Zhang, Y., Zhang, J., Gans, J.D., Bardeesy, N., *et al.* (2004). High-resolution characterization of the pancreatic adenocarcinoma genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9067-9072.
- 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.
- Akerman, K.J., Fagenson, A.M., Cyril, V., Taylor, M., Muller, M.T., Akerman, M.P., and Munro, O.Q. (2014). Gold(III) macrocycles: nucleotide-specific unconventional catalytic inhibitors of human topoisomerase I. *J Am Chem Soc* **136**, 5670-5682.
- Alagoz, M., Wells, O.S., and El-Khamisy, S.F. (2014). TDP1 deficiency sensitizes human cells to base damage via distinct topoisomerase I and PARP mechanisms with potential applications for cancer therapy. *Nucleic acids research* **42**, 3089-3103.
- Ali, A.A.E., 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. *Nature structural & molecular biology* **19**, 685-692.
- Allis, C.D., and Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature reviews Genetics* **17**, 487-500.
- Alvarez-Gonzalez, R., and Althaus, F.R. (1989). Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents. *Mutation research* **218**, 67-74.
- Ambrosini, G., Seelman, S.L., Qin, L.X., and Schwartz, G.K. (2008). The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol potentiates the effects of topoisomerase I poisons by suppressing Rad51 expression in a p53-dependent manner. *Cancer research* **68**, 2312-2320.

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. *The Journal of biological chemistry* 274, 17860-17868.

Ame, J.C., Spelnhauer, C., and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26, 882-893.

Amente, S., Gargano, B., Napolitano, G., Lania, L., and Majello, B. (2009). Camptothecin releases P-TEFb from the inactive 7SK snRNP complex. *Cell Cycle* 8, 1249-1255.

ANSM (2017). Répertoire des Spécialités Pharmaceutiques

Antony, S., Agama, K.K., Miao, Z.H., Takagi, K., Wright, M.H., Robles, A.I., Varticovski, L., Nagarajan, M., Morrell, A., Cushman, M., *et al.* (2007). Novel indenoisoquinolines NSC 725776 and NSC 724998 produce persistent topoisomerase I cleavage complexes and overcome multidrug resistance. *Cancer research* 67, 10397-10405.

Antony, S., Arimondo, P.B., Sun, J.S., and Pommier, Y. (2004a). Position- and orientation-specific enhancement of topoisomerase I cleavage complexes by triplex DNA structures. *Nucleic acids research* 32, 5163-5173.

Antony, S., Theruvathu, J.A., Brooks, P.J., Leshner, D.T., Redinbo, M., and Pommier, Y. (2004b). Enhancement of camptothecin-induced topoisomerase I cleavage complexes by the acetaldehyde adduct N2-ethyl-2'-deoxyguanosine. *Nucleic acids research* 32, 5685-5692.

Aoki, J., Katoh, H., Mori, K., and Negishi, M. (2000). Rnd1, a novel rho family GTPase, induces the formation of neuritic processes in PC12 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 278, 604-608.

Aravind, L. (2001). The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. *Trends in biochemical sciences* 26, 273-275.

Ascer, L.G., Magalhaes, Y.T., Espinha, G., Osaki, J.H., Souza, R.C., and Forti, F.L. (2015). CDC42 Gtpase Activation Affects Hela Cell DNA Repair and Proliferation Following UV Radiation-Induced Genotoxic Stress. *Journal of cellular biochemistry* 116, 2086-2097.

Ashour, M.E., Atteya, R., and El-Khamisy, S.F. (2015). Topoisomerase-mediated chromosomal break repair: an emerging player in many games. *Nature reviews Cancer* 15, 137-151.

Ashworth, A. (2008). A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 3785-3790.

Aspenstrom, P., Ruusala, A., and Pacholsky, D. (2007). Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Experimental cell research* 313, 3673-3679.

Atasheva, S., Akhrymuk, M., Frolova, E.I., and Frolov, I. (2012). New PARP gene with an anti-alphavirus function. *Journal of virology* 86, 8147-8160.

Awad, S.W., Abu-Zhayia, E.R., Guttmann-Raviv, N., and Ayoub, N. (2017). NELF-E is recruited to DNA double-strand break sites to promote transcriptional repression and repair. *EMBO reports* 18, 745-764.

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. *The Journal of biological chemistry* 282, 37738-37746.

Bailly, C. (2000). Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Current medicinal chemistry* 7, 39-58.

Bajrami, I., Frankum, J.R., Konde, A., Miller, R.E., Rehman, F.L., Brough, R., Campbell, J., Sims, D., Rafiq, R., Hooper, S., *et al.* (2014). Genome-wide profiling of genetic synthetic lethality identifies CDK12 as a novel determinant of PARP1/2 inhibitor sensitivity. *Cancer research* 74, 287-297.

Banasik, M., Komura, H., Shimoyama, M., and Ueda, K. (1992). Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *The Journal of biological chemistry* 267, 1569-1575.

- Baranello, L., Bertozzi, D., Fogli, M.V., Pommier, Y., and Capranico, G. (2010). DNA topoisomerase I inhibition by camptothecin induces escape of RNA polymerase II from promoter-proximal pause site, antisense transcription and histone acetylation at the human HIF-1 α gene locus. *Nucleic acids research* 38, 159-171.
- Baranello, L., Wojtowicz, D., Cui, K., Devaiah, B.N., Chung, H.J., Chan-Salis, K.Y., Guha, R., Wilson, K., Zhang, X., Zhang, H., *et al.* (2016). RNA Polymerase II Regulates Topoisomerase I Activity to Favor Efficient Transcription. *Cell* 165, 357-371.
- Barber, L.J., Sandhu, S., Chen, L., Campbell, J., Kozarewa, I., Fenwick, K., Assiotis, I., Rodrigues, D.N., Reis Filho, J.S., Moreno, V., *et al.* (2013). Secondary mutations in BRCA2 associated with clinical resistance to a PARP inhibitor. *The Journal of pathology* 229, 422-429.
- Barkauskaite, E., Jankevicius, G., and Ahel, I. (2015). Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation. *Molecular cell* 58, 935-946.
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., Wilson, C.J., Lehar, J., Kryukov, G.V., Sonkin, D., *et al.* (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603-607.
- Basili, S., and Moro, S. (2009). Novel camptothecin derivatives as topoisomerase I inhibitors. *Expert opinion on therapeutic patents* 19, 555-574.
- Bauer, P.I., Chen, H.J., Kenesi, E., Kenessey, I., Buki, K.G., Kirsten, E., Hakam, A., Hwang, J.I., and Kun, E. (2001). Molecular interactions between poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I) and topoisomerase I (Topo I): identification of topology of binding. *FEBS letters* 506, 239-242.
- Beck, C., Boehler, C., Guirouilh Barbat, J., Bonnet, M.E., Illuzzi, G., Ronde, P., Gauthier, L.R., Magroun, N., Rajendran, A., Lopez, B.S., *et al.* (2014). PARP3 affects the relative contribution of homologous recombination and nonhomologous end-joining pathways. *Nucleic acids research* 42, 5616-5632.
- Bendixen, C., Thomsen, B., Alsner, J., and Westergaard, O. (1990). Camptothecin-stabilized topoisomerase I-DNA adducts cause premature termination of transcription. *Biochemistry* 29, 5613-5619.
- Benjamin, R.C., and Gill, D.M. (1980). Poly(ADP-ribose) synthesis in vitro programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 255, 10502-10508.
- Beretta, G.L., Gatti, L., Perego, P., and Zaffaroni, N. (2013). Camptothecin resistance in cancer: insights into the molecular mechanisms of a DNA-damaging drug. *Current medicinal chemistry* 20, 1541-1565.
- Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A., and Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 386, 414-417.
- Berti, M., Ray Chaudhuri, A., Thangavel, S., Gomathinayagam, S., Kenig, S., Vujanovic, M., Odreman, F., Glatter, T., Graziano, S., Mendoza-Maldonado, R., *et al.* (2013). Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nature structural & molecular biology* 20, 347-354.
- Bianchini, M., Martinelli, G., Renzulli, M., Gonzalez Cid, M., and Larripa, I. (2007). cDNA microarray study to identify expression changes relevant for apoptosis in K562 cells co-treated with amifostine and imatinib. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 59, 349-360.
- Blackford, A.N., and Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular cell* 66, 801-817.
- Boamah, E.K., Kotova, E., Garabedian, M., Jarnik, M., and Tulin, A.V. (2012). Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 (PARP-1) regulates ribosomal biogenesis in Drosophila nucleoli. *PLoS genetics* 8, e1002442.
- Bopp, A., Wartlick, F., Henninger, C., Kaina, B., and Fritz, G. (2013). Rac1 modulates acute and subacute genotoxin-induced hepatic stress responses, fibrosis and liver aging. *Cell death & disease* 4, e558.
- Boswell, S.A., Ongusaha, P.P., Nghiem, P., and Lee, S.W. (2007). The protective role of a small GTPase RhoE against UVB-induced DNA damage in keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* 282, 4850-4858.
- Boureux, A., Vignal, E., Faure, S., and Fort, P. (2007). Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Molecular biology and evolution* 24, 203-216.

- Bowman, K.J., Newell, D.R., Calvert, A.H., and Curtin, N.J. (2001). Differential effects of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor NU1025 on topoisomerase I and II inhibitor cytotoxicity in L1210 cells in vitro. *British journal of cancer* 84, 106-112.
- Brill, S.J., DiNardo, S., Voelkel-Meiman, K., and Sternglanz, R. (1987). Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA. *Nature* 326, 414-416.
- Brochu, G., Duchaine, C., Thibeault, L., Lagueux, J., Shah, G.M., and Poirier, G.G. (1994). Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochimica et biophysica acta* 1219, 342-350.
- Brown, J.S., O'Carrigan, B., Jackson, S.P., and Yap, T.A. (2017). Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors. *Cancer discovery* 7, 20-37.
- 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. *The EMBO journal* 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.
- Calabrese, C.R., Almassy, R., Barton, S., Batey, M.A., Calvert, A.H., Canan-Koch, S., Durkacz, B.W., Hostomsky, Z., Kumpf, R.A., Kyle, S., *et al.* (2004). Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *Journal of the National Cancer Institute* 96, 56-67.
- Calabrese, C.R., Batey, M.A., Thomas, H.D., Durkacz, B.W., Wang, L.Z., Kyle, S., Skaltzky, D., Li, J., Zhang, C., Boritzki, T., *et al.* (2003). Identification of potent nontoxic poly(ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitors: chemopotential and pharmacological studies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 2711-2718.
- Caldecott, K.W. (2003). XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA repair* 2, 955-969.
- Camilloni, G., Di Martino, E., Caserta, M., and di Mauro, E. (1988). Eukaryotic DNA topoisomerase I reaction is topology dependent. *Nucleic acids research* 16, 7071-7085.
- Canguilhem, B., Pradines, A., Baudouin, C., Boby, C., Lajoie-Mazenc, I., Charveron, M., and Favre, G. (2005). RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 280, 43257-43263.
- Capranico, G., Ferri, F., Fogli, M.V., Russo, A., Lotito, L., and Baranello, L. (2007). The effects of camptothecin on RNA polymerase II transcription: roles of DNA topoisomerase I. *Biochimie* 89, 482-489.
- Capranico, G., Marinello, J., and Baranello, L. (2010). Dissecting the transcriptional functions of human DNA topoisomerase I by selective inhibitors: implications for physiological and therapeutic modulation of enzyme activity. *Biochimica et biophysica acta* 1806, 240-250.
- Capranico, G., Marinello, J., and Chillemi, G. (2017). Type I DNA Topoisomerases. *Journal of medicinal chemistry* 60, 2169-2192.
- Castelli, S., Vieira, S., D'Annessa, I., Katkar, P., Musso, L., Dallavalle, S., and Desideri, A. (2013). A derivative of the natural compound kakuol affects DNA relaxation of topoisomerase IB inhibiting the cleavage reaction. *Archives of biochemistry and biophysics* 530, 7-12.
- Cerrato, A., Morra, F., and Celetti, A. (2016). Use of poly ADP-ribose polymerase [PARP] inhibitors in cancer cells bearing DDR defects: the rationale for their inclusion in the clinic. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 35, 179.
- Chambon, P., Weill, J., Doly, J., Strosser, M., and Mandel, P. (1966). On the formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei. *Biochemical and biophysical research communications* 25, 638-643.
- Champoux, J.J. (1981). DNA is linked to the rat liver DNA nicking-closing enzyme by a phosphodiester bond to tyrosine. *The Journal of biological chemistry* 256, 4805-4809.
- Champoux, J.J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry* 70, 369-413.

- Chang, P., Coughlin, M., and Mitchison, T.J. (2009). Interaction between Poly(ADP-ribose) and NuMA contributes to mitotic spindle pole assembly. *Molecular biology of the cell* 20, 4575-4585.
- Chang, W., Dynek, J.N., and Smith, S. (2005). NuMA is a major acceptor of poly(ADP-ribosylation) by tankyrase 1 in mitosis. *The Biochemical journal* 391, 177-184.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R., and Boulton, S.J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular cell* 47, 497-510.
- Chardin, P. (2006). Function and regulation of Rnd proteins. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 54-62.
- Chatterjee, D., Schmitz, I., Krueger, A., Yeung, K., Kirchhoff, S., Krammer, P.H., Peter, M.E., Wyche, J.H., and Pantazis, P. (2001). Induction of apoptosis in 9-nitrocamptothecin-treated DU145 human prostate carcinoma cells correlates with de novo synthesis of CD95 and CD95 ligand and down-regulation of c-FLIP(short). *Cancer research* 61, 7148-7154.
- Chatterjee, S., Cheng, M.F., Trivedi, D., Petzold, S.J., and Berger, N.A. (1989). Camptothecin hypersensitivity in poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Cancer communications* 1, 389-394.
- Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in biochemical sciences* 20, 465-470.
- Chen, D., Vollmar, M., Rossi, M.N., Phillips, C., Kraehenbuehl, R., Slade, D., Mehrotra, P.V., von Delft, F., Crosthwaite, S.K., Gileadi, O., *et al.* (2011). Identification of macrodomain proteins as novel O-acetyl-ADP-ribose deacetylases. *The Journal of biological chemistry* 286, 13261-13271.
- 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 research* 39, 9605-9619.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell death and differentiation* 13, 994-1002.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 18475-18480.
- Clark, J.B., Ferris, G.M., and Pinder, S. (1971). Inhibition of nuclear NAD nucleosidase and poly ADP-ribose polymerase activity from rat liver by nicotinamide and 5'-methyl nicotinamide. *Biochimica et biophysica acta* 238, 82-85.
- Clarke, K., Daubon, T., Turan, N., Soulet, F., Mohd Zahari, M., Ryan, K.R., Durant, S., He, S., Herbert, J., Ankers, J., *et al.* (2015). Inference of Low and High-Grade Glioma Gene Regulatory Networks Delineates the Role of Rnd3 in Establishing Multiple Hallmarks of Cancer. *PLoS genetics* 11, e1005325.
- ClinicalTrials.gov (2017).
- Collins, I., Weber, A., and Levens, D. (2001). Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition. *Molecular and cellular biology* 21, 8437-8451.
- 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. *Molecular and cellular biology* 22, 332-342.
- Creaven, P.J., Allen, L.M., and Muggia, F.M. (1972). Plasma camptothecin (NSC-100880) levels during a 5-day course of treatment: relation to dose and toxicity. *Cancer chemotherapy reports* 56, 573-578.
- Cristini, A., Park, J.H., Capranico, G., Legube, G., Favre, G., and Sordet, O. (2016). DNA-PK triggers histone ubiquitination and signaling in response to DNA double-strand breaks produced during the repair of transcription-blocking topoisomerase I lesions. *Nucleic acids research* 44, 1161-1178.
- Croft, D.R., Crighton, D., Samuel, M.S., Lourenco, F.C., Munro, J., Wood, J., Bensaad, K., Vousden, K.H., Sansom, O.J., Ryan, K.M., *et al.* (2011). p53-mediated transcriptional regulation and activation of the actin cytoskeleton regulatory RhoC to LIMK2 signaling pathway promotes cell survival. *Cell research* 21, 666-682.

- Cseh, A.M., Fabian, Z., Sumegi, B., and Scorrano, L. (2017). Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase as therapeutic target: lessons learned from its inhibitors. *Oncotarget* 8, 50221-50239.
- Curtin, N.J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature reviews Cancer* 12, 801-817.
- Cuya, S.M., Bjornsti, M.A., and van Waardenburg, R. (2017). DNA topoisomerase-targeting chemotherapeutics: what's new? *Cancer chemotherapy and pharmacology* 80, 1-14.
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G.G. (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *The Biochemical journal* 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. *Molecular and cellular biology* 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14854-14859.
- Dantzer, F., and Santoro, R. (2013). The expanding role of PARPs in the establishment and maintenance of heterochromatin. *The FEBS journal* 280, 3508-3518.
- Daroui, P., Desai, S.D., Li, T.K., Liu, A.A., and Liu, L.F. (2004). Hydrogen peroxide induces topoisomerase I-mediated DNA damage and cell death. *The Journal of biological chemistry* 279, 14587-14594.
- Darroudi, F., Wiegant, W., Meijers, M., Friedl, A.A., van der Burg, M., Fomina, J., van Dongen, J.J., van Gent, D.C., and Zdzienicka, M.Z. (2007). Role of Artemis in DSB repair and guarding chromosomal stability following exposure to ionizing radiation at different stages of cell cycle. *Mutation research* 615, 111-124.
- Darzacq, X., Shav-Tal, Y., de Turris, V., Brody, Y., Shenoy, S.M., Phair, R.D., and Singer, R.H. (2007). In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nature structural & molecular biology* 14, 796-806.
- Das, B.B., Huang, S.Y., Murai, J., Rehman, I., Ame, J.C., Sengupta, S., Das, S.K., Majumdar, P., Zhang, H., Biard, D., *et al.* (2014). PARP1-TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage. *Nucleic acids research* 42, 4435-4449.
- de Souza, L.E., Moura Costa, M.D., Bilek, E.S., Lopes, M.H., Martins, V.R., Puschel, A.W., Mercadante, A.F., Nakao, L.S., and Zanata, S.M. (2014). STI1 antagonizes cytoskeleton collapse mediated by small GTPase Rnd1 and regulates neurite growth. *Experimental cell research* 324, 84-91.
- 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. *Biochemical pharmacology* 84, 137-146.
- del Rivero, J., and Kohn, E.C. (2017). PARP Inhibitors: The Cornerstone of DNA Repair-Targeted Therapies. *Oncology (Williston Park)* 31, 265-273.
- Delaney, C.A., Wang, L.Z., Kyle, S., White, A.W., Calvert, A.H., Curtin, N.J., Durkacz, B.W., Hostomsky, Z., and Newell, D.R. (2000). Potentiation of temozolomide and topotecan growth inhibition and cytotoxicity by novel poly(adenosine diphosphoribose) polymerase inhibitors in a panel of human tumor cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6, 2860-2867.
- Delbridge, A.R., Grabow, S., Strasser, A., and Vaux, D.L. (2016). Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nature reviews Cancer* 16, 99-109.
- Desai, S.D., Liu, L.F., Vazquez-Abad, D., and D'Arpa, P. (1997). Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin. *The Journal of biological chemistry* 272, 24159-24164.
- Desai, S.D., Zhang, H., Rodriguez-Bauman, A., Yang, J.M., Wu, X., Gounder, M.K., Rubin, E.H., and Liu, L.F. (2003). Transcription-dependent degradation of topoisomerase I-DNA covalent complexes. *Molecular and cellular biology* 23, 2341-2350.

- Deshmukh, J., Pofahl, R., and Haase, I. (2017). Epidermal Rac1 regulates the DNA damage response and protects from UV-light-induced keratinocyte apoptosis and skin carcinogenesis. *Cell death & disease* 8, e2664.
- Dexheimer, T.S., Kozekova, A., Rizzo, C.J., Stone, M.P., and Pommier, Y. (2008). The modulation of topoisomerase I-mediated DNA cleavage and the induction of DNA-topoisomerase I crosslinks by crotonaldehyde-derived DNA adducts. *Nucleic acids research* 36, 4128-4136.
- Dey, B.K., Mueller, A.C., and Dutta, A. (2014). Long non-coding RNAs as emerging regulators of differentiation, development, and disease. *Transcription* 5, e944014.
- 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.
- Dobzhansky, T. (1946). Genetics of natural populations; recombination and variability in populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 31, 269-290.
- Donawho, C.K., Luo, Y., Penning, T.D., Bauch, J.L., Bouska, J.J., Bontcheva-Diaz, V.D., Cox, B.F., DeWeese, T.L., Dillehay, L.E., Ferguson, D.C., *et al.* (2007). ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 2728-2737.
- Drolet, M. (2006). Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Molecular microbiology* 59, 723-730.
- Drolet, M., Bi, X., and Liu, L.F. (1994). Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation in vitro. *The Journal of biological chemistry* 269, 2068-2074.
- Dubash, A.D., Guilluy, C., Srougi, M.C., Boulter, E., Burrridge, K., and Garcia-Mata, R. (2011). The small GTPase RhoA localizes to the nucleus and is activated by Net1 and DNA damage signals. *PloS one* 6, e17380.
- Durand-Dubief, M., Persson, J., Norman, U., Hartsuiker, E., and Ekwall, K. (2010). Topoisomerase I regulates open chromatin and controls gene expression in vivo. *The EMBO journal* 29, 2126-2134.
- Durand-Dubief, M., Svensson, J.P., Persson, J., and Ekwall, K. (2011). Topoisomerases, chromatin and transcription termination. *Transcription* 2, 66-70.
- 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 research* 31, 5526-5533.
- El-Khamisy, S.F., Saifi, G.M., Weinfeld, M., Johansson, F., Helleday, T., Lupski, J.R., and Caldecott, K.W. (2005). Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Nature* 434, 108-113.
- Eng, W.K., Faucette, L., Johnson, R.K., and Sternglanz, R. (1988). Evidence that DNA topoisomerase I is necessary for the cytotoxic effects of camptothecin. *Molecular pharmacology* 34, 755-760.
- Espinha, G., Osaki, J.H., Costa, E.T., and Forti, F.L. (2016). Inhibition of the RhoA GTPase Activity Increases Sensitivity of Melanoma Cells to UV Radiation Effects. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016, 2696952.
- Espinha, G., Osaki, J.H., Magalhaes, Y.T., and Forti, F.L. (2015). Rac1 GTPase-deficient HeLa cells present reduced DNA repair, proliferation, and survival under UV or gamma irradiation. *Molecular and cellular biochemistry* 404, 281-297.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Eustermann, S., Brockmann, C., Mehrotra, P.V., Yang, J.C., Loakes, D., West, S.C., Ahel, I., and Neuhaus, D. (2010). Solution structures of the two PBZ domains from human APLF and their interaction with poly(ADP-ribose). *Nature structural & molecular biology* 17, 241-243.
- Falaschi, A. (2009). Binding of DNA topoisomerases I and II to replication origins. *Methods Mol Biol* 582, 131-143.
- Fan, X.C., and Steitz, J.A. (1998). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *The EMBO journal* 17, 3448-3460.

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.

FDA (2016). Rucaparib (Food and Drug Administration).

FDA (2017). Niraparib (Zejula) (Food and Drug Administration).

Fenton, A.L., Shirodkar, P., Macrae, C.J., Meng, L., and Koch, C.A. (2013). The PARP3- and ATM-dependent phosphorylation of APLF facilitates DNA double-strand break repair. *Nucleic acids research* *41*, 4080-4092.

Filliol, A., Piquet-Pellorce, C., Dion, S., Genet, V., Lucas-Clerc, C., Dantzer, F., and Samson, M. (2017). PARP2 deficiency affects invariant-NKT-cell maturation and protects mice from concanavalin A-induced liver injury. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* *313*, G399-G409.

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. *The New England journal of medicine* *361*, 123-134.

Forst, A.H., Karlberg, T., Herzog, N., Thorsell, A.G., Gross, A., Feijs, K.L., Verheugd, P., Kursula, P., Nijmeijer, B., Kremmer, E., *et al.* (2013). Recognition of mono-ADP-ribosylated ARTD10 substrates by ARTD8 macrodomains. *Structure* *21*, 462-475.

Foster, R., Hu, K.Q., Lu, Y., Nolan, K.M., Thissen, J., and Settleman, J. (1996). Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Molecular and cellular biology* *16*, 2689-2699.

Fouquin, A., Guirouilh-Barbat, J., Lopez, B., Hall, J., Amor-Gueret, M., and Pennaneach, V. (2017). PARP2 controls double-strand break repair pathway choice by limiting 53BP1 accumulation at DNA damage sites and promoting end-resection. *Nucleic acids research* *45*, 12325-12339.

Freeman, J.L., Abo, A., and Lambeth, J.D. (1996). Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *The Journal of biological chemistry* *271*, 19794-19801.

Frit, P., Barboule, N., Yuan, Y., Gomez, D., and Calsou, P. (2014). Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks. *DNA repair* *17*, 81-97.

Fritz, G., and Kaina, B. (1997). rhoB encoding a UV-inducible Ras-related small GTP-binding protein is regulated by GTPases of the Rho family and independent of JNK, ERK, and p38 MAP kinase. *The Journal of biological chemistry* *272*, 30637-30644.

Fritz, G., and Kaina, B. (2001). Transcriptional activation of the small GTPase gene rhoB by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element. *Nucleic acids research* *29*, 792-798.

Fritz, G., Kaina, B., and Aktories, K. (1995). The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *The Journal of biological chemistry* *270*, 25172-25177.

Frizzell, K.M., Gamble, M.J., Berrocal, J.G., Zhang, T., Krishnakumar, R., Cen, Y., Sauve, A.A., and Kraus, W.L. (2009). Global analysis of transcriptional regulation by poly(ADP-ribose) polymerase-1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase in MCF-7 human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* *284*, 33926-33938.

Fueller, F., and Kubatzky, K.F. (2008). The small GTPase RhoH is an atypical regulator of haematopoietic cells. *Cell communication and signaling : CCS* *6*, 6.

Fujimori, A., Harker, W.G., Kohlhagen, G., Hoki, Y., and Pommier, Y. (1995). Mutation at the catalytic site of topoisomerase I in CEM/C2, a human leukemia cell line resistant to camptothecin. *Cancer research* *55*, 1339-1346.

Fujimoto, M., Takii, R., Takaki, E., Katiyar, A., Nakato, R., Shirahige, K., and Nakai, A. (2017). The HSF1-PARP13-PARP1 complex facilitates DNA repair and promotes mammary tumorigenesis. *Nature communications* *8*, 1638.

Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z.Y., Aune, G.J., Redon, C., Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Rogakou, E.P., Celeste, A., Chen, H.T., *et al.* (2003). Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *The Journal of biological chemistry* *278*, 20303-20312.

- Gagne, J.P., Isabelle, M., Lo, K.S., Bourassa, S., Hendzel, M.J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Poirier, G.G. (2008). Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic acids research* 36, 6959-6976.
- Gagne, J.P., Rouleau, M., and Poirier, G.G. (2012). Structural biology. PARP-1 activation--bringing the pieces together. *Science* 336, 678-679.
- Gao, G., Guo, X., and Goff, S.P. (2002). Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCCH-type zinc finger protein. *Science* 297, 1703-1706.
- Garcia-Mata, R., Boulter, E., and Burridge, K. (2011). The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 493-504.
- Garcia-Palmero, I., and Villalobo, A. (2013). Deletion of the calmodulin-binding domain of Grb7 impairs cell attachment to the extracellular matrix and migration. *Biochemical and biophysical research communications* 436, 271-277.
- Garg, L.C., DiAngelo, S., and Jacob, S.T. (1987). Role of DNA topoisomerase I in the transcription of supercoiled rRNA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 3185-3188.
- Gartenberg, M.R., and Wang, J.C. (1992). Positive supercoiling of DNA greatly diminishes mRNA synthesis in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 11461-11465.
- Gelmon, K.A., Tischkowitz, M., Mackay, H., Swenerton, K., Robidoux, A., Tonkin, K., Hirte, H., Huntsman, D., Clemons, M., Gilks, B., *et al.* (2011). Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *The Lancet Oncology* 12, 852-861.
- Geng, F., Wenzel, S., and Tansey, W.P. (2012). Ubiquitin and proteasomes in transcription. *Annual review of biochemistry* 81, 177-201.
- Gibson, B.A., and Kraus, W.L. (2012). New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 411-424.
- Gibson, B.A., Zhang, Y., Jiang, H., Hussey, K.M., Shrimp, J.H., Lin, H., Schwede, F., Yu, Y., and Kraus, W.L. (2016). Chemical genetic discovery of PARP targets reveals a role for PARP-1 in transcription elongation. *Science* 353, 45-50.
- Glorian, V., Maillot, G., Poles, S., Iacovoni, J.S., Favre, G., and Vagner, S. (2011). HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* 18, 1692-1701.
- Gobert, C., Bracco, L., Rossi, F., Olivier, M., Tazi, J., Lavelle, F., Larsen, A.K., and Riou, J.F. (1996). Modulation of DNA topoisomerase I activity by p53. *Biochemistry* 35, 5778-5786.
- Goda, T., Takagi, C., and Ueno, N. (2009). Xenopus Rnd1 and Rnd3 GTP-binding proteins are expressed under the control of segmentation clock and required for somite formation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238, 2867-2876.
- Goh, L.L., and Manser, E. (2010). The RhoA GEF Syx is a target of Rnd3 and regulated via a Raf1-like ubiquitin-related domain. *PLoS one* 5, e12409.
- Goh, L.L., and Manser, E. (2012). The GTPase-deficient Rnd proteins are stabilized by their effectors. *The Journal of biological chemistry* 287, 31311-31320.
- Goldwasser, F., Shimizu, T., Jackman, J., Hoki, Y., O'Connor, P.M., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1996). Correlations between S and G2 arrest and the cytotoxicity of camptothecin in human colon carcinoma cells. *Cancer research* 56, 4430-4437.
- Gomez, M., Wu, J., Schreiber, V., Dunlap, J., Dantzer, F., Wang, Y., and Liu, Y. (2006). PARP1 is a TRF2-associated poly(ADP-ribose)polymerase and protects eroded telomeres. *Molecular biology of the cell* 17, 1686-1696.
- Gottlieb, J.A., Guarino, A.M., Call, J.B., Oliverio, V.T., and Block, J.B. (1970). Preliminary pharmacologic and clinical evaluation of camptothecin sodium (NSC-100880). *Cancer chemotherapy reports* 54, 461-470.
- Gottlieb, J.A., and Luce, J.K. (1972). Treatment of malignant melanoma with camptothecin (NSC-100880). *Cancer chemotherapy reports* 56, 103-105.

- Gottschalk, A.J., Timinszky, G., Kong, S.E., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Florens, L., Ladurner, A.G., Conaway, J.W., *et al.* (2009). Poly(ADP-ribosyl)ation directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 13770-13774.
- Grenningloh, G., Soehrman, S., Bondallaz, P., Ruchti, E., and Cadas, H. (2004). Role of the microtubule destabilizing proteins SCG10 and stathmin in neuronal growth. *Journal of neurobiology* 58, 60-69.
- Gross, A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development* 13, 1899-1911.
- Guettg, C., Scheifele, F., Rosenthal, F., Hottiger, M.O., and Santoro, R. (2012). Inheritance of silent rDNA chromatin is mediated by PARP1 via noncoding RNA. *Molecular cell* 45, 790-800.
- Guo, X., Carroll, J.W., Macdonald, M.R., Goff, S.P., and Gao, G. (2004). The zinc finger antiviral protein directly binds to specific viral mRNAs through the CCCH zinc finger motifs. *Journal of virology* 78, 12781-12787.
- Haga, R.B., and Ridley, A.J. (2016). Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases* 7, 207-221.
- Haince, J.F., McDonald, D., Rodrigue, A., Dery, U., Masson, J.Y., Hendzel, M.J., and Poirier, G.G. (2008). PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *The Journal of biological chemistry* 283, 1197-1208.
- Haluska, P., Jr., Saleem, A., Rasheed, Z., Ahmed, F., Su, E.W., Liu, L.F., and Rubin, E.H. (1999). Interaction between human topoisomerase I and a novel RING finger/arginine-serine protein. *Nucleic acids research* 27, 2538-2544.
- Harada, A., Katoh, H., and Negishi, M. (2005). Direct interaction of Rnd1 with FRS2 beta regulates Rnd1-induced down-regulation of RhoA activity and is involved in fibroblast growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 18418-18424.
- HAS (2015). Avis de la commission de la transparence : Lynparza (Haute autorité de santé).
- Hassa, P.O., Covic, M., Bedford, M.T., and Hottiger, M.O. (2008). Protein arginine methyltransferase 1 coactivates NF-kappaB-dependent gene expression synergistically with CARM1 and PARP1. *Journal of molecular biology* 377, 668-678.
- Hautefaye, P., Cimetiere, B., Pierre, A., Leonce, S., Hickman, J., Laine, W., Bailly, C., and Lavielle, G. (2003). Synthesis and pharmacological evaluation of novel non-lactone analogues of camptothecin. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 13, 2731-2735.
- Hay, T., Matthews, J.R., Pietzka, L., Lau, A., Cranston, A., Nygren, A.O., Douglas-Jones, A., Smith, G.C., Martin, N.M., O'Connor, M., *et al.* (2009). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor treatment regresses autochthonous Brca2/p53-mutant mammary tumors in vivo and delays tumor relapse in combination with carboplatin. *Cancer research* 69, 3850-3855.
- 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. *Nature immunology* 12, 37-44.
- Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 690-701.
- Henneman, L., van Miltenburg, M.H., Michalak, E.M., Braumuller, T.M., Jaspers, J.E., Drenth, A.P., de Korte-Grimmerink, R., Gogola, E., Szuhai, K., Schlicker, A., *et al.* (2015). Selective resistance to the PARP inhibitor olaparib in a mouse model for BRCA1-deficient metaplastic breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 8409-8414.
- Hinz, J.M., Helleday, T., and Meuth, M. (2003). Reduced apoptotic response to camptothecin in CHO cells deficient in XRCC3. *Carcinogenesis* 24, 249-253.
- Hirai, K., Ueda, K., and Hayaishi, O. (1983). Aberration of poly(adenosine diphosphate-ribose) metabolism in human colon adenomatous polyps and cancers. *Cancer research* 43, 3441-3446.
- Ho, H., Aruri, J., Kapadia, R., Mehr, H., White, M.A., and Ganesan, A.K. (2012). RhoJ regulates melanoma chemoresistance by suppressing pathways that sense DNA damage. *Cancer research* 72, 5516-5528.

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. *The EMBO journal* 25, 1305-1314.

Hodge, R.G., and Ridley, A.J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature reviews Molecular cell biology* 17, 496-510.

Holm, C., Covey, J.M., Kerrigan, D., and Pommier, Y. (1989). Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells. *Cancer research* 49, 6365-6368.

Horwitz, S.B., and Horwitz, M.S. (1973). Effects of camptothecin on the breakage and repair of DNA during the cell cycle. *Cancer research* 33, 2834-2836.

Hottiger, M.O., Hassa, P.O., Luscher, B., Schuler, H., and Koch-Nolte, F. (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends in biochemical sciences* 35, 208-219.

Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., and Liu, L.F. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *The Journal of biological chemistry* 260, 14873-14878.

Hsiang, Y.H., Lihou, M.G., and Liu, L.F. (1989a). Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer research* 49, 5077-5082.

Hsiang, Y.H., Liu, L.F., Wall, M.E., Wani, M.C., Nicholas, A.W., Manikumar, G., Kirschenbaum, S., Silber, R., and Potmesil, M. (1989b). DNA topoisomerase I-mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogues. *Cancer research* 49, 4385-4389.

Hsiao, S.J., and Smith, S. (2008). Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie* 90, 83-92.

Hu, Y., Petit, S.A., Ficarro, S.B., Toomire, K.J., Xie, A., Lim, E., Cao, S.A., Park, E., Eck, M.J., Scully, R., *et al.* (2014). PARP1-driven poly-ADP-ribosylation regulates BRCA1 function in homologous recombination-mediated DNA repair. *Cancer discovery* 4, 1430-1447.

Huang, H.S., Allen, J.A., Mabb, A.M., King, I.F., Miriyala, J., Taylor-Blake, B., Sciaky, N., Dutton, J.W., Jr., Lee, H.M., Chen, X., *et al.* (2011). Topoisomerase inhibitors unsilence the dormant allele of Ube3a in neurons. *Nature* 481, 185-189.

Huang, S.M., Mishina, Y.M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G.A., Charlat, O., Wietzel, E., Zhang, Y., Wiessner, S., *et al.* (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461, 614-620.

Huang, T.H., Chen, H.C., Chou, S.M., Yang, Y.C., Fan, J.R., and Li, T.K. (2010). Cellular processing determinants for the activation of damage signals in response to topoisomerase I-linked DNA breakage. *Cell research* 20, 1060-1075.

Huelsenbeck, S.C., Schorr, A., Roos, W.P., Huelsenbeck, J., Henninger, C., Kaina, B., and Fritz, G. (2012). Rac1 protein signaling is required for DNA damage response stimulated by topoisomerase II poisons. *The Journal of biological chemistry* 287, 38590-38599.

Huertas, P., and Aguilera, A. (2003). Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Molecular cell* 12, 711-721.

Husain, A., Begum, N.A., Taniguchi, T., Taniguchi, H., Kobayashi, M., and Honjo, T. (2016). Chromatin remodeller SMARCA4 recruits topoisomerase 1 and suppresses transcription-associated genomic instability. *Nature communications* 7, 10549.

Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., and Legube, G. (2010). High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *The EMBO journal* 29, 1446-1457.

Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y.H., Narzisi, G., Leotta, A., *et al.* (2012). De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 74, 285-299.

Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2003). A role of Rnd1 GTPase in dendritic spine formation in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 11065-11072.

Iyer, L., King, C.D., Whittington, P.F., Green, M.D., Roy, S.K., Tephly, T.R., Coffman, B.L., and Ratain, M.J. (1998). Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase

isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *The Journal of clinical investigation* 101, 847-854.

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

Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual review of cell and developmental biology* 21, 247-269.

Jaks, V., Joers, A., Kristjuhan, A., and Maimets, T. (2001). p53 protein accumulation in addition to the transactivation activity is required for p53-dependent cell cycle arrest after treatment of cells with camptothecin. *Oncogene* 20, 1212-1219.

Jamieson, C., Lui, C., Brocardo, M.G., Martino-Echarri, E., and Henderson, B.R. (2015). Rac1 augments Wnt signaling by stimulating beta-catenin-lymphoid enhancer factor-1 complex assembly independent of beta-catenin nuclear import. *Journal of cell science* 128, 3933-3946.

Jaxel, C., Capranico, G., Kerrigan, D., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1991). Effect of local DNA sequence on topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin. *The Journal of biological chemistry* 266, 20418-20423.

Jaxel, C., Kohn, K.W., Wani, M.C., Wall, M.E., and Pommier, Y. (1989). Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity. *Cancer research* 49, 1465-1469.

Ji, Y., and Tulin, A.V. (2010). The roles of PARP1 in gene control and cell differentiation. *Current opinion in genetics & development* 20, 512-518.

Jiang, W.G., Watkins, G., Lane, J., Cunnick, G.H., Douglas-Jones, A., Mokbel, K., and Mansel, R.E. (2003). Prognostic value of rho GTPases and rho guanine nucleotide dissociation inhibitors in human breast cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 6432-6440.

Jonas, S., and Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature reviews Genetics* 16, 421-433.

Jungmichel, S., Rosenthal, F., Altmeyer, M., Lukas, J., Hottiger, M.O., and Nielsen, M.L. (2013). Proteome-wide identification of poly(ADP-Ribosyl)ation targets in different genotoxic stress responses. *Molecular cell* 52, 272-285.

Kalisch, T., Ame, J.C., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2012). New readers and interpretations of poly(ADP-ribosyl)ation. *Trends in biochemical sciences* 37, 381-390.

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-Ribosyl)ation in regulation of centrosome function. *Molecular and cellular biology* 23, 2451-2462.

Karaulanov, E., Bottcher, R.T., Stanek, P., Wu, W., Rau, M., Ogata, S., Cho, K.W., and Niehrs, C. (2009). Unc5B interacts with FLRT3 and Rnd1 to modulate cell adhesion in *Xenopus* embryos. *PloS one* 4, e5742.

Karicheva, O., Rodriguez-Vargas, J.M., Wadier, N., Martin-Hernandez, K., Vauchelles, R., Magroun, N., Tissier, A., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2016). PARP3 controls TGFbeta and ROS driven epithelial-to-mesenchymal transition and stemness by stimulating a TG2-Snail-E-cadherin axis. *Oncotarget* 7, 64109-64123.

Karlberg, T., Langelier, M.F., Pascal, J.M., and Schuler, H. (2013). Structural biology of the writers, readers, and erasers in mono- and poly(ADP-ribose) mediated signaling. *Molecular aspects of medicine* 34, 1088-1108.

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. *The EMBO journal* 24, 1911-1920.

Katoh, H., Harada, A., Mori, K., and Negishi, M. (2002). Socius is a novel Rnd GTPase-interacting protein involved in disassembly of actin stress fibers. *Molecular and cellular biology* 22, 2952-2964.

Katsube, T., Mori, M., Tsuji, H., Shiomi, T., Shiomi, N., and Onoda, M. (2011). Differences in sensitivity to DNA-damaging Agents between XRCC4- and Artemis-deficient human cells. *Journal of radiation research* 52, 415-424.

Ke, Y., Han, Y., Guo, X., Wen, J., Wang, K., Jiang, X., Tian, X., Ba, X., Boldogh, I., and Zeng, X. (2017). Erratum: PARP1 promotes gene expression at the post-transcriptional level by modulating the RNA-binding protein HuR. *Nature communications* 8, 15191.

- Khobta, A., Ferri, F., Lotito, L., Montecucco, A., Rossi, R., and Capranico, G. (2006). Early effects of topoisomerase I inhibition on RNA polymerase II along transcribed genes in human cells. *Journal of molecular biology* 357, 127-138.
- Khoury-Haddad, H., Guttmann-Raviv, N., Ipenberg, I., Huggins, D., Jeyasekharan, A.D., and Ayoub, N. (2014). PARP1-dependent recruitment of KDM4D histone demethylase to DNA damage sites promotes double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E728-737.
- 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. *The Journal of cell biology* 146, 917-928.
- Kim, M.Y., Mauro, S., Gevry, N., Lis, J.T., and Kraus, W.L. (2004). NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* 119, 803-814.
- Kim, Y.S., Hori, M., Yasuda, K., and Ozaki, H. (2005). Differences in the gestational pattern of mRNA expression of the Rnd family in rat and human myometria. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 142, 410-415.
- Kim, Y.S., Kim, B., Karaki, H., Hori, M., and Ozaki, H. (2003). Up-regulation of Rnd1 during pregnancy serves as a negative-feedback control for Ca²⁺ sensitization of contractile elements in rat myometrium. *Biochemical and biophysical research communications* 311, 972-978.
- King, B.S., Cooper, K.L., Liu, K.J., and Hudson, L.G. (2012). Poly(ADP-ribose) contributes to an association between poly(ADP-ribose) polymerase-1 and xeroderma pigmentosum complementation group A in nucleotide excision repair. *The Journal of biological chemistry* 287, 39824-39833.
- King, I.F., Yandava, C.N., Mabb, A.M., Hsiao, J.S., Huang, H.S., Pearson, B.L., Calabrese, J.M., Starmer, J., Parker, J.S., Magnuson, T., *et al.* (2013). Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism. *Nature* 501, 58-62.
- 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. *Molecular cell* 32, 57-69.
- Klejewski, A., Swierczewska, M., Zaorska, K., Brazert, M., Nowicki, M., Zabel, M., and Januchowski, R. (2017). New and Old Genes Associated with Topotecan Resistance Development in Ovarian Cancer Cell Lines. *Anticancer research* 37, 1625-1636.
- Komatsu, H., Iguchi, T., Masuda, T., Hirata, H., Ueda, M., Kidogami, S., Ogawa, Y., Sato, K., Hu, Q., Nambara, S., *et al.* (2017). Attenuated RND1 Expression Confers Malignant Phenotype and Predicts Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Annals of surgical oncology* 24, 850-859.
- Komatsu, K., Miyashita, T., Hang, H., Hopkins, K.M., Zheng, W., Cuddeback, S., Yamada, M., Lieberman, H.B., and Wang, H.G. (2000). Human homologue of *S. pombe* Rad9 interacts with BCL-2/BCL-xL and promotes apoptosis. *Nature cell biology* 2, 1-6.
- Koster, D.A., Croquette, V., Dekker, C., Shuman, S., and Dekker, N.H. (2005). Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. *Nature* 434, 671-674.
- Kraus, W.L., and Lis, J.T. (2003). PARP goes transcription. *Cell* 113, 677-683.
- Krietsch, J., Rouleau, M., Pic, E., Ethier, C., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Masson, J.Y., Poirier, G.G., and Gagne, J.P. (2013). Reprogramming cellular events by poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Molecular aspects of medicine* 34, 1066-1087.
- Krishnakumar, R., Gamble, M.J., Frizzell, K.M., Berrocal, J.G., Kininis, M., and Kraus, W.L. (2008). Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes. *Science* 319, 819-821.
- Krishnakumar, R., and Kraus, W.L. (2010). PARP-1 regulates chromatin structure and transcription through a KDM5B-dependent pathway. *Molecular cell* 39, 736-749.
- Kroeger, P.E., and Rowe, T.C. (1992). Analysis of topoisomerase I and II cleavage sites on the *Drosophila* actin and Hsp70 heat shock genes. *Biochemistry* 31, 2492-2501.
- Krogh, S., Mortensen, U.H., Westergaard, O., and Bonven, B.J. (1991). Eukaryotic topoisomerase I-DNA interaction is stabilized by helix curvature. *Nucleic acids research* 19, 1235-1241.

- Krupitza, G., and Cerutti, P. (1989). Poly(ADP-ribosylation) of histones in intact human keratinocytes. *Biochemistry* *28*, 4054-4060.
- Kun, E., Kirsten, E., and Ordahl, C.P. (2002). Coenzymatic activity of randomly broken or intact double-stranded DNAs in auto and histone H1 trans-poly(ADP-ribosylation), catalyzed by poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I). *The Journal of biological chemistry* *277*, 39066-39069.
- Kung, J.T., Colognori, D., and Lee, J.T. (2013). Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics* *193*, 651-669.
- Kurtzberg, L.S., Roth, S., Krumbholz, R., Crawford, J., Bormann, C., Dunham, S., Yao, M., Rouleau, C., Bagley, R.G., Yu, X.J., *et al.* (2011). Genz-644282, a novel non-camptothecin topoisomerase I inhibitor for cancer treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *17*, 2777-2787.
- Lackie, R.E., Maciejewski, A., Ostapchenko, V.G., Marques-Lopes, J., Choy, W.Y., Duennwald, M.L., Prado, V.F., and Prado, M.A.M. (2017). The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in neuroscience* *11*, 254.
- Langelier, M.F., Planck, J.L., Roy, S., and Pascal, J.M. (2011). Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity. *The Journal of biological chemistry* *286*, 10690-10701.
- 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.
- Langelier, M.F., Riccio, A.A., and Pascal, J.M. (2014). PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic acids research* *42*, 7762-7775.
- Lanza, A., Tornaletti, S., Rodolfo, C., Scanavini, M.C., and Pedrini, A.M. (1996). Human DNA topoisomerase I-mediated cleavages stimulated by ultraviolet light-induced DNA damage. *The Journal of biological chemistry* *271*, 6978-6986.
- Lavergne, O., Demarquay, D., Kasprzyk, P.G., and Bigg, D.C. (2000). Homocamptothecins: E-ring modified CPT analogues. *Annals of the New York Academy of Sciences* *922*, 100-111.
- Lavergne, O., Lesueur-Ginot, L., Pla Rodas, F., Kasprzyk, P.G., Pommier, J., Demarquay, D., Prevost, G., Ulibarri, G., Rolland, A., Schiano-Liberatore, A.M., *et al.* (1998). Homocamptothecins: synthesis and antitumor activity of novel E-ring-modified camptothecin analogues. *Journal of medicinal chemistry* *41*, 5410-5419.
- Lawlor, D., Martin, P., Busschots, S., Thery, J., O'Leary, J.J., Hennessy, B.T., and Stordal, B. (2014). PARP Inhibitors as P-glycoprotein Substrates. *Journal of pharmaceutical sciences* *103*, 1913-1920.
- Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., Scott, C., Meier, W., Shapira-Frommer, R., Safra, T., *et al.* (2012). Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *The New England journal of medicine* *366*, 1382-1392.
- Lee, J.H., Lee, J.M., Kim, J.K., Ahn, S.K., Lee, S.J., Kim, M.Y., Jew, S.S., Park, J.G., and Hong, C.I. (1998). Antitumor activity of 7-[2-(N-isopropylamino)ethyl]-(20S)-camptothecin, CKD602, as a potent DNA topoisomerase I inhibitor. *Archives of pharmacological research* *21*, 581-590.
- Leshner, D.T., Pommier, Y., Stewart, L., and Redinbo, M.R. (2002). 8-Oxoguanine rearranges the active site of human topoisomerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 12102-12107.
- Leteurtre, F., Kohlhaagen, G., Fesen, M.R., Tanizawa, A., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1994). Effects of DNA methylation on topoisomerase I and II cleavage activities. *The Journal of biological chemistry* *269*, 7893-7900.
- Leung, A.K., Vyas, S., Rood, J.E., Bhutkar, A., Sharp, P.A., and Chang, P. (2011). Poly(ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm. *Molecular cell* *42*, 489-499.
- Li, M., and Yu, X. (2013). Function of BRCA1 in the DNA damage response is mediated by ADP-ribosylation. *Cancer cell* *23*, 693-704.
- Li, T.K., Houghton, P.J., Desai, S.D., Daroui, P., Liu, A.A., Hars, E.S., Ruchelman, A.L., LaVoie, E.J., and Liu, L.F. (2003). Characterization of ARC-111 as a novel topoisomerase I-targeting anticancer drug. *Cancer research* *63*, 8400-8407.

- Li, W., Sun, M., Zang, C., Ma, P., He, J., Zhang, M., Huang, Z., Ding, Y., and Shu, Y. (2016). Upregulated long non-coding RNA AGAP2-AS1 represses LATS2 and KLF2 expression through interacting with EZH2 and LSD1 in non-small-cell lung cancer cells. *Cell death & disease* 7, e2225.
- Li, Y.H., Ghavampur, S., Bondallaz, P., Will, L., Grenningloh, G., and Puschel, A.W. (2009). Rnd1 regulates axon extension by enhancing the microtubule destabilizing activity of SCG10. *The Journal of biological chemistry* 284, 363-371.
- Liehr, J.G., Harris, N.J., Mendoza, J., Ahmed, A.E., and Giovannella, B.C. (2000). Pharmacology of camptothecin esters. *Annals of the New York Academy of Sciences* 922, 216-223.
- Lin, B., Kolluri, S.K., Lin, F., Liu, W., Han, Y.H., Cao, X., Dawson, M.I., Reed, J.C., and Zhang, X.K. (2004). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 116, 527-540.
- Lin, C.P., Ban, Y., Lyu, Y.L., Desai, S.D., and Liu, L.F. (2008). A ubiquitin-proteasome pathway for the repair of topoisomerase I-DNA covalent complexes. *The Journal of biological chemistry* 283, 21074-21083.
- Lin, Y., and Zheng, Y. (2015). Approaches of targeting Rho GTPases in cancer drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* 10, 991-1010.
- Liu, L., Ke, Y., Jiang, X., He, F., Pan, L., Xu, L., Zeng, X., and Ba, X. (2012). Lipopolysaccharide activates ERK-PARP-1-RelA pathway and promotes nuclear factor-kappaB transcription in murine macrophages. *Human immunology* 73, 439-447.
- Liu, L.F., and Wang, J.C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7024-7027.
- Liu, X., Kraus, W.L., and Bai, X. (2015). Ready, pause, go: regulation of RNA polymerase II pausing and release by cellular signaling pathways. *Trends in biochemical sciences* 40, 516-525.
- Liu, X., Wang, Y., Cao, Z., Zhan, M., Vardeman, D., and Giovannella, B. (2013). Enhanced lactone stability of CZ48 in blood correlates to its lack of toxicity in mice. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 16, 115-124.
- Loirand, G., Cario-Toumaniantz, C., Chardin, P., and Pacaud, P. (1999). The Rho-related protein Rnd1 inhibits Ca²⁺ sensitization of rat smooth muscle. *The Journal of physiology* 516 (Pt 3), 825-834.
- Lotito, L., Russo, A., Bueno, S., Chillemi, G., Fogli, M.V., and Capranico, G. (2009). A specific transcriptional response of yeast cells to camptothecin dependent on the Swi4 and Mbp1 factors. *European journal of pharmacology* 603, 29-36.
- Lotito, L., Russo, A., Chillemi, G., Bueno, S., Cavalieri, D., and Capranico, G. (2008). Global transcription regulation by DNA topoisomerase I in exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation of telomere-proximal genes by TOP1 deletion. *Journal of molecular biology* 377, 311-322.
- Luijsterburg, M.S., de Krijger, I., Wiegant, W.W., Shah, R.G., Smeenk, G., de Groot, A.J.L., Pines, A., Vertegaal, A.C.O., Jacobs, J.J.L., Shah, G.M., *et al.* (2016). PARP1 Links CHD2-Mediated Chromatin Expansion and H3.3 Deposition to DNA Repair by Non-homologous End-Joining. *Molecular cell* 61, 547-562.
- 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. *Biochemical and biophysical research communications* 289, 499-506.
- Ma, W., Sze, K.M., Chan, L.K., Lee, J.M., Wei, L.L., Wong, C.M., Lee, T.K., Wong, C.C., and Ng, I.O. (2016). RhoE/ROCK2 regulates chemoresistance through NF-kappaB/IL-6/ STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 7, 41445-41459.
- MacPherson, L., Tamblyn, L., Rajendra, S., Bralha, F., McPherson, J.P., and Matthews, J. (2013). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin poly(ADP-ribose) polymerase (TiPARP, ARTD14) is a mono-ADP-ribosyltransferase and repressor of aryl hydrocarbon receptor transactivation. *Nucleic acids research* 41, 1604-1621.
- Maede, Y., Shimizu, H., Fukushima, T., Kogame, T., Nakamura, T., Miki, T., Takeda, S., Pommier, Y., and Murai, J. (2014). Differential and common DNA repair pathways for topoisomerase I- and II-targeted drugs in a genetic DT40 repair cell screen panel. *Molecular cancer therapeutics* 13, 214-220.
- Malewicz, M., Kadkhodaei, B., Kee, N., Volakakis, N., Hellman, U., Viktorsson, K., Leung, C.Y., Chen, B., Lewensohn, R., van Gent, D.C., *et al.* (2011). Essential role for DNA-PK-mediated phosphorylation of NR4A nuclear orphan receptors in DNA double-strand break repair. *Genes & development* 25, 2031-2040.

- Malyuchenko, N.V., Kotova, E.Y., Kulaeva, O.I., Kirpichnikov, M.P., and Studitskiy, V.M. (2015). PARP1 Inhibitors: antitumor drug design. *Acta naturae* 7, 27-37.
- Mamouni, K., Cristini, A., Guirouilh-Barbat, J., Monferran, S., Lemarie, A., Faye, J.C., Lopez, B.S., Favre, G., and Sordet, O. (2014). RhoB promotes gammaH2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* 34, 3144-3155.
- 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 research* 38, 6065-6077.
- Mao, Y., and Muller, M.T. (2003). Down modulation of topoisomerase I affects DNA repair efficiency. *DNA repair* 2, 1115-1126.
- Mao, Y., Okada, S., Chang, L.S., and Muller, M.T. (2000). p53 dependence of topoisomerase I recruitment in vivo. *Cancer research* 60, 4538-4543.
- Marple, T., Kim, T.M., and Hasty, P. (2006). Embryonic stem cells deficient for Brca2 or Blm exhibit divergent genotoxic profiles that support opposing activities during homologous recombination. *Mutation research* 602, 110-120.
- Marsischky, G.T., Wilson, B.A., and Collier, R.J. (1995). Role of glutamic acid 988 of human poly-ADP-ribose polymerase in polymer formation. Evidence for active site similarities to the ADP-ribosylating toxins. *The Journal of biological chemistry* 270, 3247-3254.
- Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., and Hoeijmakers, J.H. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 465-481.
- Martinez-Zamudio, R., and Ha, H.C. (2012). Histone ADP-ribosylation facilitates gene transcription by directly remodeling nucleosomes. *Molecular and cellular biology* 32, 2490-2502.
- Mashimo, M., Kato, J., and Moss, J. (2014). Structure and function of the ARH family of ADP-ribosyl-acceptor hydrolases. *DNA repair* 23, 88-94.
- 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. *Molecular and cellular biology* 18, 3563-3571.
- Mattern, M.R., Mong, S.M., Bartus, H.F., Mirabelli, C.K., Crooke, S.T., and Johnson, R.K. (1987). Relationship between the intracellular effects of camptothecin and the inhibition of DNA topoisomerase I in cultured L1210 cells. *Cancer research* 47, 1793-1798.
- McClendon, A.K., and Osheroff, N. (2006). The geometry of DNA supercoils modulates topoisomerase-mediated DNA cleavage and enzyme response to anticancer drugs. *Biochemistry* 45, 3040-3050.
- McColl, B., Garg, R., Riou, P., Riento, K., and Ridley, A.J. (2016). Rnd3-induced cell rounding requires interaction with Plexin-B2. *Journal of cell science* 129, 4046-4056.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *The EMBO journal* 16, 2794-2804.
- 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. *The Journal of biological chemistry* 286, 1767-1776.
- Mehta, A., and Haber, J.E. (2014). Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6, a016428.
- Menager, C., and Kaibuchi, K. (2003). [Rho proteins: their function in neurons]. *Medecine sciences : M/S* 19, 358-363.
- Menear, K.A., Adcock, C., Boulter, R., Cockcroft, X.L., Copsey, L., Cranston, A., Dillon, K.J., Drzewiecki, J., Garman, S., Gomez, S., *et al.* (2008). 4-[3-(4-cyclopropanecarbonylpiperazine-1-carbonyl)-4-fluorobenzyl]-2H-phthalazin-1-one: a novel bioavailable inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Journal of medicinal chemistry* 51, 6581-6591.
- 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. *The EMBO journal* 22, 2255-2263.

- Messner, S., Altmeyer, M., Zhao, H., Pozivil, A., Roschitzki, B., Gehrig, P., Rutishauser, D., Huang, D., Caflisch, A., and Hottinger, M.O. (2010). PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. *Nucleic acids research* 38, 6350-6362.
- Meyer, N., Peyret-Lacombe, A., Canguilhem, B., Medale-Giamarchi, C., Mamouni, K., Cristini, A., Monferran, S., Lamant, L., Filleron, T., Pradines, A., *et al.* (2014). RhoB promotes cancer initiation by protecting keratinocytes from UVB-induced apoptosis but limits tumor aggressiveness. *The Journal of investigative dermatology* 134, 203-212.
- Miao, Z.H., Agama, K., Sordet, O., Povirk, L., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (2006). Hereditary ataxia SCAN1 cells are defective for the repair of transcription-dependent topoisomerase I cleavage complexes. *DNA repair* 5, 1489-1494.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular cell* 11, 577-590.
- Miknyoczki, S.J., Jones-Bolin, S., Pritchard, S., Hunter, K., Zhao, H., Wan, W., Ator, M., Bihovsky, R., Hudkins, R., Chatterjee, S., *et al.* (2003). Chemopotentiation of temozolomide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Molecular cancer therapeutics* 2, 371-382.
- Milam, K.M., and Cleaver, J.E. (1984). Inhibitors of poly(adenosine diphosphate-ribose) synthesis: effect on other metabolic processes. *Science* 223, 589-591.
- Miles, S., Croxford, M.W., Abeysinghe, A.P., and Breeden, L.L. (2016). Msa1 and Msa2 Modulate G1-Specific Transcription to Promote G1 Arrest and the Transition to Quiescence in Budding Yeast. *PLoS genetics* 12, e1006088.
- Mirza, M.R., Monk, B.J., Herrstedt, J., Oza, A.M., Mahner, S., Redondo, A., Fabbro, M., Ledermann, J.A., Lorusso, D., Vergote, I., *et al.* (2016). Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *The New England journal of medicine* 375, 2154-2164.
- Miwa, M., and Sugimura, T. (1971). Splitting of the ribose-ribose linkage of poly(adenosine diphosphate-ribose) by a calf thymus extract. *The Journal of biological chemistry* 246, 6362-6364.
- Moertel, C.G., Schutt, A.J., Reitemeier, R.J., and Hahn, R.G. (1972). Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer. *Cancer chemotherapy reports* 56, 95-101.
- Monastyrskaya, K., Sanchez-Freire, V., Hashemi Gheinani, A., Klumpp, D.J., Babychuk, E.B., Draeger, A., and Burkhard, F.C. (2013). miR-199a-5p regulates urothelial permeability and may play a role in bladder pain syndrome. *The American journal of pathology* 182, 431-448.
- Monferran, S., Skuli, N., Delmas, C., Favre, G., Bonnet, J., Cohen-Jonathan-Moyal, E., and Toulas, C. (2008). Alpha5beta3 and alpha5beta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *International journal of cancer* 123, 357-364.
- Mori, K., Amano, M., Takefuji, M., Kato, K., Morita, Y., Nishioka, T., Matsuura, Y., Murohara, T., and Kaibuchi, K. (2009). Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. *The Journal of biological chemistry* 284, 5067-5076.
- Mueller-Dieckmann, C., Kernstock, S., Lisurek, M., von Kries, J.P., Haag, F., Weiss, M.S., and Koch-Nolte, F. (2006). The structure of human ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3) provides insights into the reversibility of protein ADP-ribosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 15026-15031.
- Muggia, F.M., Creaven, P.J., Hansen, H.H., Cohen, M.H., and Selawry, O.S. (1972). Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-100880): correlation with preclinical studies. *Cancer chemotherapy reports* 56, 515-521.
- Murai, J., Huang, S.Y., Das, B.B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J.H., Ji, J., Takeda, S., and Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer research* 72, 5588-5599.
- Murai, J., Huang, S.Y., Renaud, A., Zhang, Y., Ji, J., Takeda, S., Morris, J., Teicher, B., Doroshow, J.H., and Pommier, Y. (2014a). Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Molecular cancer therapeutics* 13, 433-443.
- Murai, J., Zhang, Y., Morris, J., Ji, J., Takeda, S., Doroshow, J.H., and Pommier, Y. (2014b). Rationale for poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in combination therapy with camptothecins or temozolomide based on PARP trapping versus catalytic inhibition. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 349, 408-416.

- Navarro-Lerida, I., Pellinen, T., Sanchez, S.A., Guadamillas, M.C., Wang, Y., Mirtti, T., Calvo, E., and Del Pozo, M.A. (2015). Rac1 nucleocytoplasmic shuttling drives nuclear shape changes and tumor invasion. *Developmental cell* 32, 318-334.
- Neale, B.M., Kou, Y., Liu, L., Ma'ayan, A., Samocha, K.E., Sabo, A., Lin, C.F., Stevens, C., Wang, L.S., Makarov, V., *et al.* (2012). Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* 485, 242-245.
- 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.
- Nishigaki, M., Aoyagi, K., Danjoh, I., Fukaya, M., Yanagihara, K., Sakamoto, H., Yoshida, T., and Sasaki, H. (2005a). Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer research* 65, 2115-2124.
- Nishigaki, R., Osaki, M., Hiratsuka, M., Toda, T., Murakami, K., Jeang, K.T., Ito, H., Inoue, T., and Oshimura, M. (2005b). Proteomic identification of differentially-expressed genes in human gastric carcinomas. *Proteomics* 5, 3205-3213.
- Nitiss, J., and Wang, J.C. (1988). DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 7501-7505.
- Nitiss, J.L. (2009). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature reviews Cancer* 9, 338-350.
- Nitiss, J.L., Nitiss, K.C., Rose, A., and Waltman, J.L. (2001). Overexpression of type I topoisomerases sensitizes yeast cells to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* 276, 26708-26714.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochemical Society transactions* 23, 456-459.
- Nobes, C.D., Lauritzen, I., Mattei, M.G., Paris, S., Hall, A., and Chardin, P. (1998). A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *The Journal of cell biology* 141, 187-197.
- Nomura, F., Yaguchi, M., Togawa, A., Miyazaki, M., Isobe, K., Miyake, M., Noda, M., and Nakai, T. (2000). Enhancement of poly-adenosine diphosphate-ribosylation in human hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology* 15, 529-535.
- Nordheim, A., Lafer, E.M., Peck, L.J., Wang, J.C., Stollar, B.D., and Rich, A. (1982). Negatively supercoiled plasmids contain left-handed Z-DNA segments as detected by specific antibody binding. *Cell* 31, 309-318.
- O'Connor, P.M., Nieves-Neira, W., Kerrigan, D., Bertrand, R., Goldman, J., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1991). S-phase population analysis does not correlate with the cytotoxicity of camptothecin and 10,11-methylenedioxycamptothecin in human colon carcinoma HT-29 cells. *Cancer communications* 3, 233-240.
- Oberoi, J., Richards, M.W., Crumpler, S., Brown, N., Blagg, J., and Bayliss, R. (2010). Structural basis of poly(ADP-ribose) recognition by the multizinc binding domain of checkpoint with forkhead-associated and RING Domains (CHFR). *The Journal of biological chemistry* 285, 39348-39358.
- Ogata, S., Morokuma, J., Hayata, T., Kolle, G., Niehrs, C., Ueno, N., and Cho, K.W. (2007). TGF-beta signaling-mediated morphogenesis: modulation of cell adhesion via cadherin endocytosis. *Genes & development* 21, 1817-1831.
- 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.
- Oinuma, I., Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2004a). The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science* 305, 862-865.
- Oinuma, I., Katoh, H., Harada, A., and Negishi, M. (2003). Direct interaction of Rnd1 with Plexin-B1 regulates PDZ-RhoGEF-mediated Rho activation by Plexin-B1 and induces cell contraction in COS-7 cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 25671-25677.
- Oinuma, I., Katoh, H., and Negishi, M. (2004b). Molecular dissection of the semaphorin 4D receptor plexin-B1-stimulated R-Ras GTPase-activating protein activity and neurite remodeling in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 11473-11480.

- Oinuma, I., Kawada, K., Tsukagoshi, K., and Negishi, M. (2012). Rnd1 and Rnd3 targeting to lipid raft is required for p190 RhoGAP activation. *Molecular biology of the cell* 23, 1593-1604.
- Oka, S., Kato, J., and Moss, J. (2006). Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *The Journal of biological chemistry* 281, 705-713.
- Okada, T., Sinha, S., Esposito, I., Schiavon, G., Lopez-Lago, M.A., Su, W., Pratilas, C.A., Abele, C., Hernandez, J.M., Ohara, M., *et al.* (2015). The Rho GTPase Rnd1 suppresses mammary tumorigenesis and EMT by restraining Ras-MAPK signalling. *Nature cell biology* 17, 81-94.
- Okano, S., Lan, L., Caldecott, K.W., Mori, T., and Yasui, A. (2003). Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Molecular and cellular biology* 23, 3974-3981.
- Oliver, F.J., de la Rubia, G., Rolli, V., Ruiz-Ruiz, M.C., de Murcia, G., and Murcia, J.M. (1998). Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *The Journal of biological chemistry* 273, 33533-33539.
- Olson, M.F. (2016). Rho GTPases, their post-translational modifications, disease-associated mutations and pharmacological inhibitors. *Small GTPases*, 1-13.
- Ongusaha, P.P., Kim, H.G., Boswell, S.A., Ridley, A.J., Der, C.J., Dotto, G.P., Kim, Y.B., Aaronson, S.A., and Lee, S.W. (2006). RhoE is a pro-survival p53 target gene that inhibits ROCK 1-mediated apoptosis in response to genotoxic stress. *Current biology : CB* 16, 2466-2472.
- Osaki, J.H., Espinha, G., Magalhaes, Y.T., and Forti, F.L. (2016). Modulation of RhoA GTPase Activity Sensitizes Human Cervix Carcinoma Cells to gamma-Radiation by Attenuating DNA Repair Pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016, 6012642.
- Ossovskaya, V., Koo, I.C., Kaldjian, E.P., Alvares, C., and Sherman, B.M. (2010). Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types. *Genes & cancer* 1, 812-821.
- Otsuki, M., Seki, M., Kawabe, Y., Inoue, E., Dong, Y.P., Abe, T., Kato, G., Yoshimura, A., Tada, S., and Enomoto, T. (2007). WRN counteracts the NHEJ pathway upon camptothecin exposure. *Biochemical and biophysical research communications* 355, 477-482.
- Ozaki, Y., Matsui, H., Asou, H., Nagamachi, A., Aki, D., Honda, H., Yasunaga, S., Takihara, Y., Yamamoto, T., Izumi, S., *et al.* (2012). Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation. *Molecular cell* 47, 694-706.
- Papini, E., Schiavo, G., Sandona, D., Rappuoli, R., and Montecucco, C. (1989). Histidine 21 is at the NAD⁺ binding site of diphtheria toxin. *The Journal of biological chemistry* 264, 12385-12388.
- Parrish, K.E., Cen, L., Murray, J., Calligaris, D., Kizilbash, S., Mittapalli, R.K., Carlson, B.L., Schroeder, M.A., Sludden, J., Boddy, A.V., *et al.* (2015). Efficacy of PARP Inhibitor Rucaparib in Orthotopic Glioblastoma Xenografts Is Limited by Ineffective Drug Penetration into the Central Nervous System. *Molecular cancer therapeutics* 14, 2735-2743.
- Passero, F.C., Jr., Grapsa, D., Syrigos, K.N., and Saif, M.W. (2016). The safety and efficacy of Onivyde (irinotecan liposome injection) for the treatment of metastatic pancreatic cancer following gemcitabine-based therapy. *Expert review of anticancer therapy* 16, 697-703.
- Patel, A.G., Flatten, K.S., Schneider, P.A., Dai, N.T., McDonald, J.S., Poirier, G.G., and Kaufmann, S.H. (2012). Enhanced killing of cancer cells by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and topoisomerase I inhibitors reflects poisoning of both enzymes. *The Journal of biological chemistry* 287, 4198-4210.
- Paysan, L., Piquet, L., Saltel, F., and Moreau, V. (2016). Rnd3 in Cancer: A Review of the Evidence for Tumor Promoter or Suppressor. *Molecular cancer research : MCR* 14, 1033-1044.
- Peak, J.G., and Peak, M.J. (1990). Ultraviolet light induces double-strand breaks in DNA of cultured human P3 cells as measured by neutral filter elution. *Photochemistry and photobiology* 52, 387-393.
- Pehrson, J.R., and Fried, V.A. (1992). MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257, 1398-1400.

- Pines, A., Vrouwe, M.G., Marteijn, J.A., Typas, D., Luijsterburg, M.S., Cansoy, M., Hensbergen, P., Deelder, A., de Groot, A., Matsumoto, S., *et al.* (2012). PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *The Journal of cell biology* 199, 235-249.
- 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. *The Journal of biological chemistry* 275, 40974-40980.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature reviews Cancer* 6, 789-802.
- Pommier, Y. (2013). Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS chemical biology* 8, 82-95.
- Pommier, Y., Barcelo, J.M., Rao, V.A., Sordet, O., Jobson, A.G., Thibaut, L., Miao, Z.H., Seiler, J.A., Zhang, H., Marchand, C., *et al.* (2006). Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 81, 179-229.
- Pommier, Y., and Cushman, M. (2009). The indenoisoquinoline noncamptothecin topoisomerase I inhibitors: update and perspectives. *Molecular cancer therapeutics* 8, 1008-1014.
- Pommier, Y., Huang, S.Y., Gao, R., Das, B.B., Murai, J., and Marchand, C. (2014). Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). *DNA repair* 19, 114-129.
- Pommier, Y., Kohlhagen, G., Laco, G.S., Kroth, H., Sayer, J.M., and Jerina, D.M. (2002). Different effects on human topoisomerase I by minor groove and intercalated deoxyguanosine adducts derived from two polycyclic aromatic hydrocarbon diol epoxides at or near a normal cleavage site. *The Journal of biological chemistry* 277, 13666-13672.
- Pommier, Y., Kohlhagen, G., Pourquier, P., Sayer, J.M., Kroth, H., and Jerina, D.M. (2000a). Benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in DNA are potent suppressors of a normal topoisomerase I cleavage site and powerful inducers of other topoisomerase I cleavages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2040-2045.
- Pommier, Y., Laco, G.S., Kohlhagen, G., Sayer, J.M., Kroth, H., and Jerina, D.M. (2000b). Position-specific trapping of topoisomerase I-DNA cleavage complexes by intercalated benzo[a]-pyrene diol epoxide adducts at the 6-amino group of adenine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10739-10744.
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., and Marchand, C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & biology* 17, 421-433.
- Pommier, Y., O'Connor, M.J., and de Bono, J. (2016a). Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action. *Science translational medicine* 8, 362ps317.
- Pommier, Y., Pourquier, P., Fan, Y., and Strumberg, D. (1998). Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et biophysica acta* 1400, 83-105.
- Pommier, Y., Pourquier, P., Urasaki, Y., Wu, J., and Laco, G.S. (1999). Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2, 307-318.
- Pommier, Y., Redon, C., Rao, V.A., Seiler, J.A., Sordet, O., Takemura, H., Antony, S., Meng, L., Liao, Z., Kohlhagen, G., *et al.* (2003). Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutation research* 532, 173-203.
- Pommier, Y., Sun, Y., Huang, S.N., and Nitiss, J.L. (2016b). Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nature reviews Molecular cell biology* 17, 703-721.
- Porter, A.P., Papaioannou, A., and Malliri, A. (2016). Deregulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases* 7, 123-138.
- Porter, S.E., and Champoux, J.J. (1989). The basis for camptothecin enhancement of DNA breakage by eukaryotic topoisomerase I. *Nucleic acids research* 17, 8521-8532.
- Pouliot, J.J., Yao, K.C., Robertson, C.A., and Nash, H.A. (1999). Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. *Science* 286, 552-555.
- Pourquier, P., Bjornsti, M.A., and Pommier, Y. (1998). Induction of topoisomerase I cleavage complexes by the vinyl chloride adduct 1,N6-ethenoadenine. *The Journal of biological chemistry* 273, 27245-27249.
- Pourquier, P., and Lansiaux, A. (2011). [Molecular determinants of response to topoisomerase I inhibitors]. *Bulletin du cancer* 98, 1287-1298.

- Pourquier, P., Pilon, A.A., Kohlhagen, G., Mazumder, A., Sharma, A., and Pommier, Y. (1997a). Trapping of mammalian topoisomerase I and recombinations induced by damaged DNA containing nicks or gaps. Importance of DNA end phosphorylation and camptothecin effects. *The Journal of biological chemistry* *272*, 26441-26447.
- Pourquier, P., and Pommier, Y. (2001). Topoisomerase I-mediated DNA damage. *Advances in cancer research* *80*, 189-216.
- Pourquier, P., Ueng, L.M., Kohlhagen, G., Mazumder, A., Gupta, M., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1997b). Effects of uracil incorporation, DNA mismatches, and abasic sites on cleavage and religation activities of mammalian topoisomerase I. *The Journal of biological chemistry* *272*, 7792-7796.
- Pourquier, P., Waltman, J.L., Urasaki, Y., Loktionova, N.A., Pegg, A.E., Nitiss, J.L., and Pommier, Y. (2001). Topoisomerase I-mediated cytotoxicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: trapping of topoisomerase I by the O6-methylguanine. *Cancer research* *61*, 53-58.
- Powell, W.T., Coulson, R.L., Gonzales, M.L., Cray, F.K., Wong, S.S., Adams, S., Ach, R.A., Tsang, P., Yamada, N.A., Yasui, D.H., *et al.* (2013). R-loop formation at Snord116 mediates topotecan inhibition of Ube3a-antisense and allele-specific chromatin decondensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 13938-13943.
- Prasad, R., Lavrik, O.I., Kim, S.J., Kedar, P., Yang, X.P., Vande Berg, B.J., and Wilson, S.H. (2001). DNA polymerase beta - mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry* *276*, 32411-32414.
- Prise, K.M., Davies, S., and Michael, B.D. (1989). Cell killing and DNA damage in Chinese hamster V79 cells treated with hydrogen peroxide. *International journal of radiation biology* *55*, 583-592.
- Prokop, A., Beaven, R., Qu, Y., and Sanchez-Soriano, N. (2013). Using fly genetics to dissect the cytoskeletal machinery of neurons during axonal growth and maintenance. *Journal of cell science* *126*, 2331-2341.
- Puc, J., Kozbial, P., Li, W., Tan, Y., Liu, Z., Suter, T., Ohgi, K.A., Zhang, J., Aggarwal, A.K., and Rosenfeld, M.G. (2015). Ligand-dependent enhancer activation regulated by topoisomerase-I activity. *Cell* *160*, 367-380.
- Purnell, M.R., and Whish, W.J. (1980). Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *The Biochemical journal* *185*, 775-777.
- Qi, F., Liu, X., Wu, H., Yu, X., Wei, C., Huang, X., Ji, G., Nie, F., and Wang, K. (2017). Long noncoding AGAP2-AS1 is activated by SP1 and promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer. *Journal of hematology & oncology* *10*, 48.
- Rahden-Staron, I., Szumilo, M., Grosicka, E., Kraakman van der Zwet, M., and Zdzienicka, M.Z. (2003). Defective Brca2 influences topoisomerase I activity in mammalian cells. *Acta biochimica Polonica* *50*, 139-144.
- Ray Chaudhuri, A., Hashimoto, Y., Herrador, R., Neelsen, K.J., Fachinetti, D., Bermejo, R., Cocito, A., Costanzo, V., and Lopes, M. (2012). Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. *Nature structural & molecular biology* *19*, 417-423.
- Ray Chaudhuri, A., and Nussenzweig, A. (2017). The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* *18*, 610-621.
- Reale, A., Matteis, G.D., Galleazzi, G., Zampieri, M., and Caiafa, P. (2005). Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene* *24*, 13-19.
- Redinbo, M.R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J.J., and Hol, W.G. (1998). Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* *279*, 1504-1513.
- Regairaz, M., Zhang, Y.W., Fu, H., Agama, K.K., Tata, N., Agrawal, S., Aladjem, M.I., and Pommier, Y. (2011). Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I-DNA complexes. *The Journal of cell biology* *195*, 739-749.
- Ribeyre, C., Zellweger, R., Chauvin, M., Bec, N., Larroque, C., Lopes, M., and Constantinou, A. (2016). Nascent DNA Proteomics Reveals a Chromatin Remodeler Required for Topoisomerase I Loading at Replication Forks. *Cell reports* *15*, 300-309.
- Ridley, A.J. (2013). RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *Journal of microscopy* *251*, 242-249.

- Ridley, A.J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. *Current opinion in cell biology* 36, 103-112.
- Riou, P., Kjaer, S., Garg, R., Purkiss, A., George, R., Cain, R.J., Bineva, G., Reymond, N., McColl, B., Thompson, A.J., *et al.* (2013). 14-3-3 proteins interact with a hybrid prenyl-phosphorylation motif to inhibit G proteins. *Cell* 153, 640-653.
- Riou, P., Villalonga, P., and Ridley, A.J. (2010). Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 32, 986-992.
- Rivory, L.P., Bowles, M.R., Robert, J., and Pond, S.M. (1996). Conversion of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase. *Biochemical pharmacology* 52, 1103-1111.
- 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. *The Journal of experimental medicine* 206, 1047-1056.
- Robert, I., Gaudot, L., Rogier, M., Heyer, V., Noll, A., Dantzer, F., and Reina-San-Martin, B. (2015). Parp3 negatively regulates immunoglobulin class switch recombination. *PLoS genetics* 11, e1005240.
- Robert, J. (2010). Signalisation cellulaire et cancer, Vol Chapitre 10 - La voie des sémaphorines.
- Roberts, P.J., Mitin, N., Keller, P.J., Chenette, E.J., Madigan, J.P., Currin, R.O., Cox, A.D., Wilson, O., Kirschmeier, P., and Der, C.J. (2008). Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *The Journal of biological chemistry* 283, 25150-25163.
- Robu, M., Shah, R.G., Petitclerc, N., Brind'Amour, J., Kandan-Kulangara, F., and Shah, G.M. (2013). Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 1658-1663.
- Rohm, B., Rahim, B., Kleiber, B., Hovatta, I., and Puschel, A.W. (2000). The semaphorin 3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases. *FEBS letters* 486, 68-72.
- Rosenthal, F., Feijs, K.L., Frugier, E., Bonalli, M., Forst, A.H., Imhof, R., Winkler, H.C., Fischer, D., Caflisch, A., Hassa, P.O., *et al.* (2013). Macrodomein-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases. *Nature structural & molecular biology* 20, 502-507.
- Rossi, F., Labourier, E., Forne, T., Divita, G., Derancourt, J., Riou, J.F., Antoine, E., Cathala, G., Brunel, C., and Tazi, J. (1996). Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* 381, 80-82.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 17079-17084.
- Ruf, A., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1998). Inhibitor and NAD⁺ binding to poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and homology modeling. *Biochemistry* 37, 3893-3900.
- Ruf, A., Mennissier de Murcia, J., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1996). Structure of the catalytic fragment of poly(ADP-ribose) polymerase from chicken. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7481-7485.
- Ruihua, H., Mengyi, Z., Chong, Z., Meng, Q., Xin, M., Qiulin, T., Feng, B., and Ming, L. (2016). RhoA regulates resistance to irinotecan by regulating membrane transporter and apoptosis signaling in colorectal cancer. *Oncotarget* 7, 87136-87146.
- 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. *Molecular cell* 41, 33-45.
- Ruscetti, T., Lehnert, B.E., Halbrook, J., Le Trong, H., Hoekstra, M.F., Chen, D.J., and Peterson, S.R. (1998). Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase. *The Journal of biological chemistry* 273, 14461-14467.
- Rutherford, S., Hampton, G.M., Frierson, H.F., and Moskaluk, C.A. (2005). Mapping of candidate tumor suppressor genes on chromosome 12 in adenoid cystic carcinoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 85, 1076-1085.

- Ryan, A.J., Squires, S., Strutt, H.L., and Johnson, R.T. (1991). Camptothecin cytotoxicity in mammalian cells is associated with the induction of persistent double strand breaks in replicating DNA. *Nucleic acids research* 19, 3295-3300.
- Sakasai, R., Teraoka, H., Takagi, M., and Tibbetts, R.S. (2010). Transcription-dependent activation of ataxia telangiectasia mutated prevents DNA-dependent protein kinase-mediated cell death in response to topoisomerase I poison. *The Journal of biological chemistry* 285, 15201-15208.
- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Acharya, S., Fishel, R., and Alnemri, E.S. (1999). Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *The Journal of biological chemistry* 274, 17941-17945.
- Sandrock, K., Bielek, H., Schradi, K., Schmidt, G., and Klugbauer, N. (2010). The nuclear import of the small GTPase Rac1 is mediated by the direct interaction with karyopherin alpha2. *Traffic* 11, 198-209.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal* 17, 1675-1687.
- Schaefer, A., Reinhard, N.R., and Hordijk, P.L. (2014). Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation. *Small GTPases* 5, 6.
- Schmidt, B.H., Osheroff, N., and Berger, J.M. (2012). Structure of a topoisomerase II-DNA-nucleotide complex reveals a new control mechanism for ATPase activity. *Nature structural & molecular biology* 19, 1147-1154.
- Schoeffler, A.J., and Berger, J.M. (2005). Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochemical Society transactions* 33, 1465-1470.
- Schoeffler, A.J., and Berger, J.M. (2008). DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Quarterly reviews of biophysics* 41, 41-101.
- Schreiber, V., Ame, J.C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Menissier-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. *The Journal of biological chemistry* 277, 23028-23036.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C., and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 517-528.
- Schreiber, V., Molinete, M., Boeuf, H., de Murcia, G., and Menissier-de Murcia, J. (1992). The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *The EMBO journal* 11, 3263-3269.
- Seiler, J.A., Conti, C., Syed, A., Aladjem, M.I., and Pommier, Y. (2007). The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: single-cell and -DNA fiber analyses. *Molecular and cellular biology* 27, 5806-5818.
- Seol, Y., Zhang, H., Pommier, Y., and Neuman, K.C. (2012). A kinetic clutch governs religation by type IB topoisomerases and determines camptothecin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 16125-16130.
- Shao, R.G., Cao, C.X., Nieves-Neira, W., Dimanche-Boitrel, M.T., Solary, E., and Pommier, Y. (2001). Activation of the Fas pathway independently of Fas ligand during apoptosis induced by camptothecin in p53 mutant human colon carcinoma cells. *Oncogene* 20, 1852-1859.
- Shao, R.G., Cao, C.X., Shimizu, T., O'Connor, P.M., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1997). Abrogation of an S-phase checkpoint and potentiation of camptothecin cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in human cancer cell lines, possibly influenced by p53 function. *Cancer research* 57, 4029-4035.
- 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. *The EMBO journal* 18, 1397-1406.
- Sharifi, R., Morra, R., Appel, C.D., Tallis, M., Chioza, B., Jankevicius, G., Simpson, M.A., Matic, I., Ozkan, E., Golia, B., *et al.* (2013). Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease. *The EMBO journal* 32, 1225-1237.

- Shen, L., Qin, K., Wang, D., Zhang, Y., Bai, N., Yang, S., Luo, Y., Xiang, R., and Tan, X. (2014). Overexpression of Oct4 suppresses the metastatic potential of breast cancer cells via Rnd1 downregulation. *Biochimica et biophysica acta* 1842, 2087-2095.
- Shimizu, T., and Pommier, Y. (1997). Camptothecin-induced apoptosis in p53-null human leukemia HL60 cells and their isolated nuclei: effects of the protease inhibitors Z-VAD-fmk and dichloroisocoumarin suggest an involvement of both caspases and serine proteases. *Leukemia* 11, 1238-1244.
- Shykind, B.M., Kim, J., Stewart, L., Champoux, J.J., and Sharp, P.A. (1997). Topoisomerase I enhances TFIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription. *Genes & development* 11, 397-407.
- Sims, R.J., 3rd, Belotserkovskaya, R., and Reinberg, D. (2004). Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes & development* 18, 2437-2468.
- Sirikantaramas, S., Yamazaki, M., and Saito, K. (2008). Mutations in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer alkaloid camptothecin in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 6782-6786.
- Skuli, N., Monferran, S., Delmas, C., Lajoie-Mazenc, I., Favre, G., Toulas, C., and Cohen-Jonathan-Moyal, E. (2006). Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization through glycogen synthase kinase-3 in U87 glioblastoma cells. *Cancer research* 66, 482-489.
- Slade, D., Dunstan, M.S., Barkauskaite, E., Weston, R., Lafite, P., Dixon, N., Ahel, M., Leys, D., and Ahel, I. (2011). The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Nature* 477, 616-620.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., *et al.* (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of cell biology* 144, 281-292.
- Smeenk, G., Wiegant, W.W., Martejn, J.A., Luijsterburg, M.S., Sroczynski, N., Costelloe, T., Romeijn, R.J., Pastink, A., Mailand, N., Vermeulen, W., *et al.* (2013). Poly(ADP-ribosyl)ation links the chromatin remodeler SMARCA5/SNF2H to RNF168-dependent DNA damage signaling. *Journal of cell science* 126, 889-903.
- Smith, L.M., Willmore, E., Austin, C.A., and Curtin, N.J. (2005). The novel poly(ADP-Ribose) polymerase inhibitor, AG14361, sensitizes cells to topoisomerase I poisons by increasing the persistence of DNA strand breaks. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 8449-8457.
- Smith, S., and de Lange, T. (2000). Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Current biology : CB* 10, 1299-1302.
- Smith, S., Giriat, L., Schmitt, A., and de Lange, T. (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484-1487.
- Solary, E., Bertrand, R., and Pommier, Y. (1994). Apoptosis induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors in human leukemic HL-60 cells. *Leukemia & lymphoma* 15, 21-32.
- Solary, E., Droin, N., Bettaieb, A., Corcos, L., Dimanche-Boitrel, M.T., and Garrido, C. (2000). Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia* 14, 1833-1849.
- Solary, E., Plenchette, S., Sordet, O., Rebe, C., Ducoroy, P., Filomenko, R., Bruey, J.M., Droin, N., and Corcos, L. (2001). Modulation of apoptotic pathways triggered by cytotoxic agents. *Therapie* 56, 511-518.
- Solier, S., Ryan, M.C., Martin, S.E., Varma, S., Kohn, K.W., Liu, H., Zeeberg, B.R., and Pommier, Y. (2013). Transcription poisoning by Topoisomerase I is controlled by gene length, splice sites, and miR-142-3p. *Cancer research* 73, 4830-4839.
- Sollier, J., Stork, C.T., Garcia-Rubio, M.L., Paulsen, R.D., Aguilera, A., and Cimprich, K.A. (2014). Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability. *Molecular cell* 56, 777-785.
- Song, R., Gu, J., Liu, X., Zhu, J., Wang, Q., Gao, Q., Zhang, J., Cheng, L., Tong, X., Qi, X., *et al.* (2014). Inhibition of osteoclast bone resorption activity through osteoprotegerin-induced damage of the sealing zone. *International journal of molecular medicine* 34, 856-862.
- Sonnenblick, A., de Azambuja, E., Azim, H.A., Jr., and Piccart, M. (2015). An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting. *Nature reviews Clinical oncology* 12, 27-41.

- Sordet, O., Khan, Q.A., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (2003). Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Current medicinal chemistry Anti-cancer agents* 3, 271-290.
- Sordet, O., Khan, Q.A., Plo, I., Pourquier, P., Urasaki, Y., Yoshida, A., Antony, S., Kohlhagen, G., Solary, E., Saparbaev, M., *et al.* (2004a). Apoptotic topoisomerase I-DNA complexes induced by staurosporine-mediated oxygen radicals. *The Journal of biological chemistry* 279, 50499-50504.
- Sordet, O., Khan, Q.A., and Pommier, Y. (2004b). Apoptotic topoisomerase I-DNA complexes induced by oxygen radicals and mitochondrial dysfunction. *Cell Cycle* 3, 1095-1097.
- Sordet, O., Liao, Z., Liu, H., Antony, S., Stevens, E.V., Kohlhagen, G., Fu, H., and Pommier, Y. (2004c). Topoisomerase I-DNA complexes contribute to arsenic trioxide-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 279, 33968-33975.
- Sordet, O., Nakamura, A.J., Redon, C.E., and Pommier, Y. (2010). DNA double-strand breaks and ATM activation by transcription-blocking DNA lesions. *Cell Cycle* 9, 274-278.
- Sordet, O., Redon, C.E., Guirouilh-Barbat, J., Smith, S., Solier, S., Douarre, C., Conti, C., Nakamura, A.J., Das, B.B., Nicolas, E., *et al.* (2009). Ataxia telangiectasia mutated activation by transcription- and topoisomerase I-induced DNA double-strand breaks. *EMBO reports* 10, 887-893.
- Sordet, O., and Solier, S. (2012). Chapter 19 - Topoisomerases and Apoptosis. In *DNA Topoisomerases and Cancer*, Y. Pommier, ed. (New York: Humana Press).
- Soret, J., Gabut, M., Dupon, C., Kohlhagen, G., Stevenin, J., Pommier, Y., and Tazi, J. (2003). Altered serine/arginine-rich protein phosphorylation and exonic enhancer-dependent splicing in Mammalian cells lacking topoisomerase I. *Cancer research* 63, 8203-8211.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Molecular cell* 1, 949-957.
- Srougi, M.C., and BurrIDGE, K. (2011). The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage. *PloS one* 6, e17108.
- Staker, B.L., Feese, M.D., Cushman, M., Pommier, Y., Zembower, D., Stewart, L., and Burgin, A.B. (2005). Structures of three classes of anticancer agents bound to the human topoisomerase I-DNA covalent complex. *Journal of medicinal chemistry* 48, 2336-2345.
- Staker, B.L., Hjerrild, K., Feese, M.D., Behnke, C.A., Burgin, A.B., Jr., and Stewart, L. (2002). The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15387-15392.
- Steffen, J.D., and Pascal, J.M. (2013). New players to the field of ADP-ribosylation make the final cut. *The EMBO journal* 32, 1205-1207.
- Stewart, A.F., Herrera, R.E., and Nordheim, A. (1990). Rapid induction of c-fos transcription reveals quantitative linkage of RNA polymerase II and DNA topoisomerase I enzyme activities. *Cell* 60, 141-149.
- Stewart, L., Ireton, G.C., and Champoux, J.J. (1996). The domain organization of human topoisomerase I. *The Journal of biological chemistry* 271, 7602-7608.
- Stewart, L., Ireton, G.C., and Champoux, J.J. (1997). Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. *Journal of molecular biology* 269, 355-372.
- Stewart, L., Redinbo, M.R., Qiu, X., Hol, W.G., and Champoux, J.J. (1998). A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science* 279, 1534-1541.
- Strumberg, D., Pilon, A.A., Smith, M., Hickey, R., Malkas, L., and Pommier, Y. (2000). Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Molecular and cellular biology* 20, 3977-3987.
- Subramanian, D., Rosenstein, B.S., and Muller, M.T. (1998). Ultraviolet-induced DNA damage stimulates topoisomerase I-DNA complex formation in vivo: possible relationship with DNA repair. *Cancer research* 58, 976-984.

- Suehiro, J., Kanki, Y., Makihara, C., Schadler, K., Miura, M., Manabe, Y., Aburatani, H., Kodama, T., and Minami, T. (2014). Genome-wide approaches reveal functional vascular endothelial growth factor (VEGF)-inducible nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 binding to angiogenesis-related genes in the endothelium. *The Journal of biological chemistry* 289, 29044-29059.
- Sugimura, K., Takebayashi, S., Taguchi, H., Takeda, S., and Okumura, K. (2008). PARP-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA. *The Journal of cell biology* 183, 1203-1212.
- Sugimura, T., Yoshimura, N., Miwa, M., Nagai, H., and Nagao, M. (1971). Studies on poly(adenosine diphosphate-ribose). XI. Purification of poly(adenosine diphosphate-ribose) on a hydroxylapatite column. *Archives of biochemistry and biophysics* 147, 660-665.
- Swisher, E.M., Lin, K.K., Oza, A.M., Scott, C.L., Giordano, H., Sun, J., Konecny, G.E., Coleman, R.L., Tinker, A.V., O'Malley, D.M., *et al.* (2017). Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 18, 75-87.
- Szostak, E., and Gebauer, F. (2013). Translational control by 3'-UTR-binding proteins. *Briefings in functional genomics* 12, 58-65.
- Tait, S.W., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 621-632.
- Takagi, K., Dexheimer, T.S., Redon, C., Sordet, O., Agama, K., Lavielle, G., Pierre, A., Bates, S.E., and Pommier, Y. (2007). Novel E-ring camptothecin keto analogues (S38809 and S39625) are stable, potent, and selective topoisomerase I inhibitors without being substrates of drug efflux transporters. *Molecular cancer therapeutics* 6, 3229-3238.
- Takano, T., Xu, C., Funahashi, Y., Namba, T., and Kaibuchi, K. (2015). Neuronal polarization. *Development* 142, 2088-2093.
- Thomas, H.D., Calabrese, C.R., Batey, M.A., Canan, S., Hostomsky, Z., Kyle, S., Maegley, K.A., Newell, D.R., Skaltitzky, D., Wang, L.Z., *et al.* (2007). Preclinical selection of a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor for clinical trial. *Molecular cancer therapeutics* 6, 945-956.
- Tian, X., Chen, G., Xing, H., Weng, D., Guo, Y., and Ma, D. (2007). The relationship between the down-regulation of DNA-PKcs or Ku70 and the chemosensitization in human cervical carcinoma cell line HeLa. *Oncology reports* 18, 927-932.
- Timinszky, G., Till, S., Hassa, P.O., Hothorn, M., Kustatscher, G., Nijmeijer, B., Colombelli, J., Altmeyer, M., Stelzer, E.H., Scheffzek, K., *et al.* (2009). A macrodomain-containing histone rearranges chromatin upon sensing PARP1 activation. *Nature structural & molecular biology* 16, 923-929.
- Tuduri, S., Crabbe, L., Conti, C., Tourriere, H., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., Pantescio, V., De Vos, J., Thomas, A., Theillet, C., *et al.* (2009). Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nature cell biology* 11, 1315-1324.
- Tuncel, H., Tanaka, S., Oka, S., Nakai, S., Fukutomi, R., Okamoto, M., Ota, T., Kaneko, H., Tatsuka, M., and Shimamoto, F. (2012). PARP6, a mono(ADP-ribosyl) transferase and a negative regulator of cell proliferation, is involved in colorectal cancer development. *International journal of oncology* 41, 2079-2086.
- Turcotte, S., Desrosiers, R.R., and Beliveau, R. (2003). HIF-1alpha mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma. *Journal of cell science* 116, 2247-2260.
- Turtoi, A., Brown, I., Oskamp, D., and Schneeweiss, F.H. (2008). Early gene expression in human lymphocytes after gamma-irradiation-a genetic pattern with potential for biodosimetry. *International journal of radiation biology* 84, 375-387.
- 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. *Biochemical and biophysical research communications* 46, 516-523.
- Vaux, D.L., and Silke, J. (2003). Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 304, 499-504.
- Vayssiere, B., Zalcman, G., Mahe, Y., Mirey, G., Ligensa, T., Weidner, K.M., Chardin, P., and Camonis, J. (2000). Interaction of the Grb7 adapter protein with Rnd1, a new member of the Rho family. *FEBS letters* 467, 91-96.
- Vega, F.M., and Ridley, A.J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS letters* 582, 2093-2101.

Veloso, A., Biewen, B., Paulsen, M.T., Berg, N., Carmo de Andrade Lima, L., Prasad, J., Bedi, K., Magnuson, B., Wilson, T.E., and Ljungman, M. (2013). Genome-wide transcriptional effects of the anti-cancer agent camptothecin. *PloS one* *8*, e78190.

Viard, T., and de la Tour, C.B. (2007). Type IA topoisomerases: a simple puzzle? *Biochimie* *89*, 456-467.

VIDAL (2017). LYNPARZA 50 mg gél.

Voeller, D.M., Grem, J.L., Pommier, Y., Paull, K., and Allegra, C.J. (2000). Identification and proposed mechanism of action of thymidine kinase inhibition associated with cellular exposure to camptothecin analogs. *Cancer chemotherapy and pharmacology* *45*, 409-416.

Vyas, S., Matic, I., Uchima, L., Rood, J., Zaja, R., Hay, R.T., Ahel, I., and Chang, P. (2014). Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Nature communications* *5*, 4426.

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. *Molecular and cellular biology* *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. *Nature biotechnology* *30*, 283-288.

Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E., Palmer, K.H., McPhail, A.T., and Sim, G.A. (1966). Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata* 1,2. *Journal of the American Chemical Society* *88*, 3888-3890.

Wang, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature reviews Molecular cell biology* *3*, 430-440.

Wang, M., Guo, L., Wu, Q., Zeng, T., Lin, Q., Qiao, Y., Wang, Q., Liu, M., Zhang, X., Ren, L., *et al.* (2014). ATR/Chk1/Smurf1 pathway determines cell fate after DNA damage by controlling RhoB abundance. *Nature communications* *5*, 4901.

Wang, X., Henningfeld, K.A., and Hecht, S.M. (1998). DNA topoisomerase I-mediated formation of structurally modified DNA duplexes. Effects of metal ions and topoisomerase I inhibitors. *Biochemistry* *37*, 2691-2700.

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 & development* *26*, 235-240.

Wartlick, F., Bopp, A., Henninger, C., and Fritz, G. (2013). DNA damage response (DDR) induced by topoisomerase II poisons requires nuclear function of the small GTPase Rac. *Biochimica et biophysica acta* *1833*, 3093-3103.

Welsby, I., Hutin, D., Gueydan, C., Kruys, V., Rongvaux, A., and Leo, O. (2014). PARP12, an interferon-stimulated gene involved in the control of protein translation and inflammation. *The Journal of biological chemistry* *289*, 26642-26657.

Wennerberg, K., and Der, C.J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of cell science* *117*, 1301-1312.

Wennerberg, K., Forget, M.A., Ellerbroek, S.M., Arthur, W.T., BurrIDGE, K., Settleman, J., Der, C.J., and Hansen, S.H. (2003). Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Current biology : CB* *13*, 1106-1115.

Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science* *118*, 843-846.

Westmark, C.J., Bartleson, V.B., and Malter, J.S. (2005). RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light. *Oncogene* *24*, 502-511.

Wittenberg, C., and Reed, S.I. (2005). Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene* *24*, 2746-2755.

Wojciak-Stothard, B., Zhao, L., Oliver, E., Dubois, O., Wu, Y., Kardassis, D., Vasilaki, E., Huang, M., Mitchell, J.A., Harrington, L.S., *et al.* (2012). Role of RhoB in the regulation of pulmonary endothelial and smooth muscle cell responses to hypoxia. *Circulation research* *110*, 1423-1434.

- Wojtowicz, K., Januchowski, R., Nowicki, M., and Zabel, M. (2017). vPARP Adjusts MVP Expression in Drug-resistant Cell Lines in Conjunction with MDR Proteins. *Anticancer research* 37, 3015-3023.
- Wu, J., and Liu, L.F. (1997). Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription. *Nucleic acids research* 25, 4181-4186.
- Wunnenberg-Stapleton, K., Blitz, I.L., Hashimoto, C., and Cho, K.W. (1999). Involvement of the small GTPases XRhoA and XRnd1 in cell adhesion and head formation in early *Xenopus* development. *Development* 126, 5339-5351.
- Xiang, G., Yi, Y., Weiwei, H., and Weiming, W. (2016). RND1 is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma and promotes the growth and migration of cancer cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37, 773-779.
- Yan, Q., Xu, R., Zhu, L., Cheng, X., Wang, Z., Manis, J., and Shipp, M.A. (2013). BAL1 and its partner E3 ligase, BBAP, link Poly(ADP-ribose) activation, ubiquitylation, and double-strand DNA repair independent of ATM, MDC1, and RNF8. *Molecular and cellular biology* 33, 845-857.
- Yan, Y., Greer, P.M., Cao, P.T., Kolb, R.H., and Cowan, K.H. (2012). RAC1 GTPase plays an important role in gamma-irradiation induced G2/M checkpoint activation. *Breast cancer research : BCR* 14, R60.
- Yan, Y., Hein, A.L., Etekpó, A., Burchett, K.M., Lin, C., Enke, C.A., Batra, S.K., Cowan, K.H., and Ouellette, M.M. (2014). Inhibition of RAC1 GTPase sensitizes pancreatic cancer cells to gamma-irradiation. *Oncotarget* 5, 10251-10270.
- 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. *The EMBO journal* 25, 4350-4360.
- Yeo, C.D., Lee, S.H., Kim, J.S., Kim, S.J., Kim, S.C., Kim, Y.K., Kang, H.H., Yoon, H.K., Song, J.S., Moon, H.S., *et al.* (2013). A multicenter phase II study of belotecan, a new camptothecin analogue, in elderly patients with previously untreated, extensive-stage small cell lung cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 72, 809-814.
- Ying, S., Hamdy, F.C., and Helleday, T. (2012). Mre11-dependent degradation of stalled DNA replication forks is prevented by BRCA2 and PARP1. *Cancer research* 72, 2814-2821.
- Yoshinari, T., Ohkubo, M., Fukasawa, K., Egashira, S., Hara, Y., Matsumoto, M., Nakai, K., Arakawa, H., Morishima, H., and Nishimura, S. (1999). Mode of action of a new indolocarbazole anticancer agent, J-107088, targeting topoisomerase I. *Cancer research* 59, 4271-4275.
- Yu, M., Schreek, S., Cerni, C., Schamberger, C., Lesniewicz, K., Poreba, E., Vervoorts, J., Walsemann, G., Grotzinger, J., Kremmer, E., *et al.* (2005). PARP-10, a novel Myc-interacting protein with poly(ADP-ribose) polymerase activity, inhibits transformation. *Oncogene* 24, 1982-1993.
- Yukawa, K., Tanaka, T., Yoshida, K., Takeuchi, N., Ito, T., Takamatsu, H., Kikutani, H., and Kumanogoh, A. (2010). Sema4A induces cell morphological changes through B-type plexin-mediated signaling. *International journal of molecular medicine* 25, 225-230.
- Yung, T.M., Sato, S., and Satoh, M.S. (2004). Poly(ADP-ribosyl)ation as a DNA damage-induced post-translational modification regulating poly(ADP-ribose) polymerase-1-topoisomerase I interaction. *The Journal of biological chemistry* 279, 39686-39696.
- Zanata, S.M., Hovatta, I., Rohm, B., and Puschel, A.W. (2002). Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 471-477.
- Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J.A., Herrador, R., Vindigni, A., and Lopes, M. (2015). Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *The Journal of cell biology* 208, 563-579.
- Zhang, C., Lu, J., Liu, B., Cui, Q., and Wang, Y. (2016). Primate-specific miR-603 is implicated in the risk and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Aging* 8, 272-290.
- Zhang, H., Wang, J.C., and Liu, L.F. (1988). Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 1060-1064.

Zhang, Y., Liu, S., Mickanin, C., Feng, Y., Charlat, O., Michaud, G.A., Schirle, M., Shi, X., Hild, M., Bauer, A., *et al.* (2011a). RNF146 is a poly(ADP-ribose)-directed E3 ligase that regulates axin degradation and Wnt signalling. *Nature cell biology* *13*, 623-629.

Zhang, Y., Wang, J., Ding, M., and Yu, Y. (2013). Site-specific characterization of the Asp- and Glu-ADP-ribosylated proteome. *Nature methods* *10*, 981-984.

Zhang, Y.W., Regairaz, M., Seiler, J.A., Agama, K.K., Doroshow, J.H., and Pommier, Y. (2011b). Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. *Nucleic acids research* *39*, 3607-3620.

Zheng, D., Worthington, J., Timms, J.F., and Woo, P. (2013). HNRNPA1 interacts with a 5'-flanking distal element of interleukin-6 and upregulates its basal transcription. *Genes and immunity* *14*, 479-486.

Zhou, J., Li, K., Gu, Y., Feng, B., Ren, G., Zhang, L., Wang, Y., Nie, Y., and Fan, D. (2011). Transcriptional up-regulation of RhoE by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes epithelial to mesenchymal transition of gastric cancer cells during hypoxia. *Biochemical and biophysical research communications* *415*, 348-354.

Zhou, Y., Gwadry, F.G., Reinhold, W.C., Miller, L.D., Smith, L.H., Scherf, U., Liu, E.T., Kohn, K.W., Pommier, Y., and Weinstein, J.N. (2002). Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects. *Cancer research* *62*, 1688-1695.

Zhu, Y., and Gao, G. (2008). ZAP-mediated mRNA degradation. *RNA biology* *5*, 65-67.

ANNEXES

Article 2

RND1 regulates migration of human glioblastoma stem-like cells according to their anatomical localization and defines a prognostic signature in glioblastoma

Sabrina Boyrie, Caroline Delmas, Vincent Lubrano, Perrine Dahan, Laure Malric, Anthony Lemarié, José Luis, Julia Gilhodes, Marie Tosolini, Laetitia Mouly, Maxime Lehmann, Christine Toulas*, Elizabeth Cohen-Jonathan Moyal* and Sylvie Monferran*.

* S. Monferran, C. Toulas and E. Cohen-Jonathan Moyal equally contributed to the supervision of the study.

Au cours de ma thèse, j'ai participé à un autre sujet de recherche portant sur RND1 avec l'équipe du Pr Moyal du CRCT à Toulouse. Dans cette étude, j'ai apporté mon expertise scientifique sur RND1 et technique sur la RT-PCRq, sur les anticorps reconnaissant la protéine RND1 surexprimée et sur le choix des séquences inhibitrices de l'expression de RND1.

Cette étude concerne les glioblastomes, tumeurs cérébrales de haut grade, dont la médiane de survie après diagnostic est de 15 mois. Le traitement actuel de ces tumeurs est la chirurgie, lorsqu'elle est possible, suivie d'une radiothérapie (60 Gy) et du témozolomide, un agent alkylant. La plupart des patients récidivent dans la zone irradiée ou à distance de cette zone, dans le parenchyme cérébral. L'échec thérapeutique est dépendant de l'hétérogénéité tumorale, qui est une des caractéristiques des glioblastomes. Au sein de la tumeur, des cellules de glioblastome présentant des caractéristiques souches (CSG) ont été isolées et sont responsables du développement et du maintien de la tumeur. Ces CSG sont plus résistantes à la radiothérapie et au témodal, présentent des propriétés d'invasion plus grandes que la population tumorale différenciée. Des données cliniques montrent que les patients possédant une tumeur en contact avec la zone subventriculaire (PVZ+) récidivent plus rapidement et avec une infiltration dans le cerveau plus étendue et plus lointaine que patients possédant une tumeur qui n'est pas en contact avec la zone subventriculaire (PVZ-). L'hypothèse de ce travail était que la plus grande capacité d'infiltration des tumeurs PVZ+ pouvait être expliquée par une capacité d'invasion plus grande des CSG issues de la PVZ.

Pour déterminer si les capacités de migration des CSG pouvaient dépendre de leur localisation tumorale, en collaboration avec un neurochirurgien, pour un même patient, des échantillons tumoraux issus de la PVZ et en zone corticale ont été prélevés. Les CSG ont ensuite été isolées à partir de ces échantillons. Nous avons montré que les CSG issues de la PVZ possédaient un profil transcriptomique différent des CSG PVZ-. De plus, les CSG issues de la PVZ ont des capacités d'exploration de leur environnement plus importantes que les CSG PVZ-. Parmi les gènes impliqués dans l'adhésion/migration différentiellement exprimés entre les CSG PVZ+ et PVZ-, RND1 est moins exprimé dans les CSG PVZ+ par rapport au CSG PVZ-. La surexpression de RND1 dans les CSG PVZ+ entraîne une inhibition de leurs capacités d'adhésion et migratoires. A l'inverse, l'inhibition de RND1 dans les CSG PVZ- augmente leurs propriétés d'adhésion et de migration. Nous avons également mis en évidence que RND1 était moins exprimé dans les glioblastomes par rapport au tissu sain. L'analyse de la base de données TCGA a montré que la sous-expression de RND1 chez les patients atteints de glioblastome était un facteur de mauvais pronostic. Grâce à l'étude des voies de signalisation activées chez les patients sous-exprimant RND1, nous avons identifié une signature moléculaire, *RND1*^{low}, qui est un facteur pronostic indépendant de la réponse des patients atteints de glioblastome au traitement standard. Cette signature moléculaire a permis le dépôt d'un brevet avec l'INSERM transfert. Ces résultats contribuent à expliquer la récurrence plus rapide des patients PVZ+ et soulignent l'importance des gènes qui établissent la signature *RND1*^{low} comme des cibles pour diminuer le risque de rechute après traitement.

RND1 regulates migration of human glioblastoma stem-like cells according to their anatomical localization and defines a prognostic signature in glioblastoma

Sabrina Boyrie^{1,2}, Caroline Delmas^{1,2}, Vincent Lubrano^{3,4}, Perrine Dahan¹, Laure Malric^{1,5}, Anthony Lemarié^{1,5}, José Luis⁶, Julia Gilhodes², Marie Tosolini¹, Laetitia Mouly^{1,5}, Maxime Lehmann⁷, Christine Toulas^{1,2,*}, Elizabeth Cohen-Jonathan Moyal^{1,2,*} and Sylvie Monferran^{1,5,*}.

* S. Monferran, C. Toulas and E. Cohen-Jonathan Moyal equally contributed to the supervision of the study.

1. INSERM UMR1037, Cancer Research Center of Toulouse, Oncopole, Toulouse, France.
2. Institut Claudius Regaud, IUCT-O, Toulouse, France
3. INSERM UMR825, Université Toulouse III, Toulouse, France.
4. Service de Neurochirurgie, Centre Hospitalier de Purpan, Université Toulouse III, Toulouse, France
5. Université Toulouse III, Toulouse, France.
6. Centre de Recherche en Oncologie biologique et Oncopharmacologie (CRO2), INSERM UMR 911, Marseille, France ; Aix-Marseille Université, Marseille, France
7. UMR 7213 CNRS, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Tumoral Signaling and Therapeutic Targets, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France

5 keywords: Glioblastoma stem-like cells; periventricular zone; migration; alpha6 integrin; RND1.

Funding:

This work was supported by ARC fondation (M2R20100600500), Fondation de France 201300038423, ITMO Cancer (ASC15031BSA and ASC14074BSA), Region Midi-Pyrenees (INSERM R14075BB), INSERM (U1037SE13BA, U1037SE14BA, U1037SE15BA), RITC fondation (RPH11003BBA) and GRICR (R080)

Corresponding authors :

-Sylvie Monferran, INSERM UMR1037 CRCT, Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopole, 2 avenue Hubert Curien Oncopole 31037 TOULOUSE CEDEX 1, France. Tel : (33) 5 82 74 16 15. E-mail: sylvie.monferran@inserm.fr

-Christine Toulas, INSERM UMR1037 CRCT, Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopole, 1 avenue Irène Joliot-Curie 31059 TOULOUSE Cedex 9, France. Tel : (33) 5 31 15 52 20, Fax : (33) 5 31 15 52 24. E-mail: toulas.christine@iuct-oncopole.fr

-Elizabeth Cohen-Jonathan-Moyal, INSERM UMR1037 CRCT, Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopole, 1 avenue Irène Joliot-Curie 31059 TOULOUSE Cedex 9, France. Tel : (33) 5 31 15 54 45, E-mail: moyal.elizabeth@iuct-oncopole.fr

Conflict of interest:

ECJM has served as advisory board member for Merck-Serono.

The other cited authors, which all concurred with the present article, declare no potential conflicts of interest

Total number of figures: 5

Total number of tables: 1

Abbreviations:

FCSM: medium supplemented with 10 % of FCS

GB: glioblastoma

GSCs: glioblastoma stem-like cells

GSM: glioblastoma stem cell medium

CT: cortical area

PVZ: periventricular zone

PVZ+: tumors contacting the PVZ

PVZ-: tumors not in contact with the PVZ

Abstract:

Despite post-operative radio-chemotherapy, glioblastoma systematically locally recurs. Tumors contacting the periventricular zone (PVZ) show earlier and more distant relapses than tumors not contacting the PVZ. Glioblastoma stem-like cells (GSCs) have been proposed to be responsible for the recurrence. To test whether GSC migration properties could be different according to their anatomical location (PVZ+/PVZ-), we established paired cultures of GSCs from the cortical area (CT) and the PVZ of glioblastoma patient tumors. We identified specific transcriptomic profiles in CT versus PVZ populations and demonstrated that PVZ GSCs possess higher migration capacities than CT GSCs. Among migration genes differentially expressed between CT and PVZ GSCs, we showed a down-regulation of the RhoGTPase, *RND1*. Overexpression of *RND1*, dramatically inhibited PVZ GSC migration and conversely, downregulation of *RND1* increased CT GSC migration. Transcriptomic analyses revealed a down-regulation of *RND1* in glioblastoma compared to normal brain and, using the glioblastoma TCGA database, we showed that low levels of *RND1* are correlated with a decreased overall survival of patients. Finally, based on signaling pathways activated in patients with low levels of *RND1*, we identified an *RND1*^{low} signature of six genes (MET, LAMC1, ITGA5, COL5A1, COL3A1, COL1A2) that is an independent prognostic factor in glioblastoma. These findings contribute to explain the shorter time to progression of patients with PVZ involvement and, point out genes that establish the *RND1*^{low} signature as key targets to decrease the risk of tumor relapse after treatment.

Introduction:

Despite combined modality treatment, including surgery and radio-chemotherapy, the prognosis of patients with glioblastoma remains extremely poor [1]. Almost all the patients will die of a relapse in radiation fields or away from the radiation fields, in the brain parenchyma [2]. The failure of initial therapies and thus, the relapse is dependent on tumor heterogeneity, shown to be crucial in glioblastoma [3, 4]. In an attempt to classify diffuse gliomas, subgroups have been defined based on gene expression profiles and genetic and epigenetic alterations [5]. Moreover, high-resolution genome-wide studies have revealed that multiple clones harbouring a variety of genetic alterations coexist within the same tumor [6]. Molecular heterogeneity exists even at cellular level between cells that carry similar genetic alterations and is induced by environmental factors [3, 4]. Expanding single glioblastoma cells into clonal populations demonstrated unique properties including proliferation, differentiation, and different sensitivities to chemotherapeutic drugs [3]. Finally, among patients with proneural tumor, an increased tumor heterogeneity was correlated to a decreased survival [4].

A subset of glioma cells called glioma stem-like cells (GSCs) form heterogeneous glial tumors. They are responsible for the development and the maintenance of tumors [7] and have been proposed to be responsible for tumor recurrences. GSCs display higher resistance to conventional radio-chemotherapy treatments than non GSCs [8, 9]. After treating mice with temozolomide, an alkylating drug currently used in standard glioblastoma treatment, GSCs can still form new tumors [10]. GSCs preferentially reside in perivascular niches where they interact and communicate with tumor associated endothelial cells, via their basement membrane [11]. When orthotopically xenografted, GSCs form tumors that recapitulate the phenotype of patient tumors, notably the ability of

glioblastoma cells to infiltrate diffusely [12]. Finally, GSCs are more invasive than their differentiated progeny cells [13].

To invade, glioma cells must initiate dynamic changes in the cytoskeleton organization, notably via integrins [14]. Integrins specifically bind to extracellular matrix proteins, connect their cytoplasmic domain to cytoskeleton and signaling proteins. In this way, integrins control RhoGTPases and actin reorganization that leads to cell migration. Among integrins expressed in glioblastoma cell lines, $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ integrins are involved in glioma invasion and progression to high-grade glioma [15]. The fibronectin receptor, $\alpha 5\beta 1$ integrin, has also been shown as a promising therapeutic target for high-grade glioma [16]. Besides, elevated expression of $\alpha 6$ integrin from samples of glioblastoma patients is also correlated with a poor patient prognosis [17]. Two studies demonstrate that GSCs overexpressed $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ integrins in comparison to non-GSCs [17, 18] suggesting a role of these laminin receptors in GSC invasion. A better understanding of GSC migration toward their microenvironment, notably through integrin involvement, may influence the development of more effective therapies for glioblastoma.

In relation with tumor heterogeneity, clinical data, including ours, demonstrates that relapses in glioblastoma after radio-chemotherapy are more aggressive in tumors contacting the PVZ (PVZ+) than in PVZ- tumors. PVZ+ patients progress quicker and have a decreased overall survival compared to those with tumors not contacting the PVZ (PVZ-) [19-21]. We hypothesized that the high capacity of PVZ+ tumors to diffusely infiltrate could be explained by a highest migration capacity of GSCs of PVZ+ tumor in comparison to GSCs from the cortical zone (CT). To investigate this, we established GSC paired cultures from CT and PVZ tumor part for two patients diagnosed with glioblastoma. We

demonstrated that gene expression hallmarks of GSCs are dependent on their anatomical origin and that PVZ GSCs possess higher migration capacities than CT GSCs. Among migration genes differentially expressed between CT and PVZ GSCs, we showed that overexpression of the RhoGTPase, RND1, dramatically inhibited PVZ GSC migration and downregulation of RND1 increased CT GSC migration. *In silico* analysis showed that low expression of RND1 constitutes a bad prognosis factor for glioblastoma patients. Finally, based on this data, we identified six genes that define a RND1^{low} signature that is an independent prognostic factor in glioblastoma.

Results:

Characterization and molecular heterogeneity of GSCs derived from CT and PVZ

Glioblastoma samples from two patients were removed from enhanced contrast regions on MRI in the CT and in the PVZ (figure 1A). We established paired cultures of CT and PVZ GSCs (CT1, PVZ1, CT2, and PVZ2) and analyzed their stemness properties. CT and PVZ cells expressed neural tumor stem cell markers *CD133*, *NESTIN*, *OLIG1*, *OLIG2*, *SOX2* and *A2B5* [22] (figure 1B, supplemental figures 1A and 1B). After culture in DMEM-F12 supplemented with 10% FCS (FCSM), CT and PVZ GSCs were able to differentiate into neuronal-like and astrocytic-like cells (supplemental figure 1C) and to express differentiation markers (*GFAP*, *TUJ1*, *MAL* and *OMG*) [22] (figure 1C). We established with a classic limiting dilution assay that CT and PVZ neurospheres gave rise to secondary neurospheres (figure 1D). Both CT and PVZ GSCs had the ability to form diffusely infiltrated tumors when xenografted in nude mice brain (figure 1E). Altogether,

our data shows that CT and PVZ cells derived from our patient samples possess GSC characteristics.

To determine whether PVZ GSCs possess a specific genomic signature, we performed a gene expression microarray. As shown on figure 1F, different patterns of gene expression have been obtained according to the initial tumor location of the GSCs. We identified 108 genes differentially expressed between CT and PVZ cells ($p < 0.001$), associated with essential biological functions including cell adhesion, apoptosis, transcription and metabolic process. Up-regulated genes in PVZ GSC included RhoGTPase activating protein 18, transcription factor DP-2 and mannosidase alpha whereas down-regulated genes in PVZ cells included collagen type XI-alpha1, RhoGTPase, *RNDI* and protocadherin beta3 (supplementary table 1). Besides these protein coding genes, CT and PVZ cells differ in the expression of gene expression regulators (antisense RNA, miRNA, long intergenic RNA) and of regulators that guide chemical modifications of others RNAs (small nucleolar RNA...) (supplementary table 2). These results demonstrate the molecular heterogeneity of GSCs according to their brain tumor location, notably in the migration processes.

Laminin-induced migration is increased in PVZ GSCs compared to CT GSCs

Cell spreading is the first step of cell migration. GSCs reside preferentially in perivascular niches and interact with brain blood vessel basement membrane [23]. First, to compare CT and PVZ GSCs migration properties, we performed spreading assays on laminin, fibronectin and vitronectin, three extracellular matrix proteins found in the basement membrane of brain blood vessels and involved in glioma pathogenesis [15-17].

We showed that laminin is a critical extracellular matrix protein for CT and PVZ GSCs and that there was no difference of cell spreading on laminin according to the tumor location (figure 2A and supplemental figure 2A). To further characterize migration properties of these GSCs, we performed directional migration assay in Transwells coated on their undersurface with fibronectin or laminin. None of the GSCs was able to migrate toward fibronectin whereas they all successfully migrated toward laminin (figure 2B). No significant difference in GSC haptotaxis toward laminin was observed regardless of their initial location in the brain. To sharpen the characterization of GSC migration, we performed time-lapse videomicroscopy of single GSCs seeded on laminin. Quantification of single cell migration revealed that PVZ GSCs migrated significantly faster than CT GSCs -as shown by the mean velocity determination- demonstrating differential migration capacities according to the original tumor location (figure 2C). This result shows that PVZ GSCs have a higher capacity to explore their environment and to scatter into it than CT GSCs. All the GSCs migrated in different directions over the entire surface and no difference in directional persistence was observed according to the tumor location (figure 2C). These results showed that laminin is a permissive substrate for CT and PVZ GSC migration and that some GSC migration properties are dependent on their location in the brain.

RND1 is down-regulated in PVZ GSCs in comparison to CT GSCs

To explain why PVZ GSCs migrate significantly faster than CT GSCs on laminin, we first determined the expression of the main receptors for laminin in glioma cells, ie $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta4$ and $\alpha3\beta1$ integrins [18, 24]. By RT-qPCR, we showed that $\alpha6$ integrin and

β 1 integrin mRNAs were strongly expressed in GSCs whereas α 3 integrin and β 4 integrin mRNAs were weakly expressed (figure 3A). FACS analyses determined that CT and PVZ GSCs expressed α 6 integrin and β 1 integrin at high levels on their surfaces, and did not express β 4 integrin (figure 3B). Integrin expression may slightly differ between GSC lines, but independently of the initial tumor location of GSCs. In order to determine whether the integrin involved in laminin GSCs spreading could be different between CT and PVZ cells, we performed cell spreading assays using functional blocking antibodies. As shown in figure 3C, inhibition of α 6 integrin significantly decreased CT1 and PVZ1 GSC spreading in a similar manner. Besides integrins, we highlighted in our gene expression microarray fourteen genes, including *RND1*, known to be involved in migration that were differentially expressed between CT and PVZ cells (figure 1F). Of the fourteen significantly altered genes, three were up-regulated and eleven were down-regulated in PVZ GSCs (figure 3D). *RND1* expression is significantly down-regulated in PVZ GSCs in comparison to CT GSCs (pPVZ1/CT1: 0.000019; pPVZ2/CT2: 0.00000497). *RND1* regulates cell adhesion via the inhibition of the formation of actin stress fibers [25]. As RhoGTPases are known regulators of cell migration and have been recently demonstrated as key elements of glioma pathogenesis [26], we focused our study on the role of *RND1*, a RhoGTPase, in GSC migration. By RT-qPCR, we confirmed the significant down-regulation of *RND1* mRNA in PVZ GSCs in comparison to CT GSCs (figure 3E). To conclude, PVZ GSCs possess both lower levels of *RND1* and higher migration properties in comparison to CT GSCs.

RND1 suppresses GSC spreading and migration towards laminin

To test a potential correlation between *RND1* low-level expression and PVZ GSCs high migration, we investigated whether high levels of RND1 protein in PVZ cells could decrease their migration ability. PVZ1 cells were transfected with a plasmid encoding a fusion protein of EGFP and RND1 (PVZ1-RND1) or with a plasmid encoding EGFP (PVZ1-EGFP). GFP positive or GFP negative GSCs were selected by FACS. We confirmed *RND1* overexpression in GFP positive PVZ1-RND1 GSCs by RT-qPCR (figure 4A). We then showed that, three hours after seeding on laminin, GFP positive PVZ1-RND1 cells remained round and stayed in suspension whereas GFP negative PVZ1-RND1 cells spread on laminin (figure 4B) like the control cells (data not shown). Furthermore, overexpression of RND1 in PVZ1 cells dramatically decreased their ability to migrate toward laminin after 24 h in laminin-coated Transwells (figure 4C). We next investigated the consequence of RND1 loss on migration in CT1 cells. CT1 cells were transduced with lentiviral particles expressing a shRNA directed *RND1* (CT1 sh*RND1*) or a control shRNA (CT1 shC). *RND1* expression was down regulated in stably transduced CT1 sh*RND1* cells in comparison to CT1 shC (figure 4D). RND1 loss induces a slight but significant increase in mean velocity (figure 4E) and in cell spreading (figure 4F). These results demonstrated that RND1 suppresses spreading and migration abilities of GSCs. Together our data indicates that the differential RND1 expression level between PVZ and CT GSCs may explain, at least in part, their different migration profiles.

Low expression of *RND1* is correlated with a poor prognosis in patients with glioblastoma

As loss of *RND1* is involved in GSCs migration from PVZ+ tumors, known to be more aggressive than PVZ- tumors [19-21], we tested whether *RND1* gene expression could be correlated with glioblastoma prognosis. First, we analyzed *RND1* expression by RT-qPCR in normal brain tissues, in several glioblastoma cell lines and in GSCs established in our laboratory. *RND1* expression is significantly down regulated in glioblastoma cells compared to normal tissues (figure 5A). To pursue our analysis, using gene expression databases in open access, a meta-analysis of *RND1* expression revealed a significant down-regulation of *RND1* in glioblastoma samples versus normal tissues ($p < 0.05$, figure 5B). Using TCGA database, we next examined whether this down-regulation of *RND1* was related to the prognosis of glioblastoma patients. Patients with an underexpression of *RND1* (*i.e.* ≤ 4.8) showed a worse survival than those with an overexpression of *RND1* (HR=0.59, 95% CI:0.37-0.94, $p=0.028$) (figure 5C). As patients with an overexpression of *RND1*, the 26 patients with an underexpression of *RND1* are divided into the different biological clinical parameters (supplementary table 3). Furthermore, the 26 patients with an underexpression of *RND1* mostly belong to the mesenchymal subtype. These results clearly demonstrated that expression of *RND1* is a prognosis factor of survival for patients with glioblastoma.

***RND1*^{low} signature is an independent prognostic factor in glioblastoma**

To determine which signaling pathways controlled by *RND1* might be involved in the prognosis of glioblastoma recurrence and thus survival, we performed a functional

enrichment of genes in patients with low expression of *RNDI* (*RNDI*^{low}). In these patients, we identified thirteen signaling pathways that are activated (figure 5D and supplementary table 4). The most significant being are the “extracellular matrix-receptor interaction” pathway ($p=1.32 \times 10^{-9}$), the “focal adhesion” pathway ($p=1.05 \times 10^{-7}$) and the “lysosome” pathway ($p=1.72 \times 10^{-4}$). This raised the hypothesis that genes from these pathways could be involved in the worse survival prognosis of patients with low *RNDI* expression. To assess the relationship with overall survival of *RNDI* and genes from “extracellular matrix-receptor interaction” and “focal adhesion” pathways, a penalized cox regression model with lasso selection was used. We identified an *RNDI*^{low} signature of six genes (*ITGA5*, *COL3A1*, *COL5A1*, *MET*, *COL1A2*, *LAMC1*) that are significantly associated with overall survival (supplementary table 5). These genes were all significantly overexpressed in patients with low *RNDI* expression compared to patients with high *RNDI* expression (figure 5E). We then calculated the signature risk score for each patient in the TCGA database and divided them into a high-risk group and a low-risk group by taking the mean value of risk score. The median overall survival in the low-risk group is 17.8 months versus 13.8 months for the high-risk group (figure 5F). To validate our prognostic signature, we applied the risk score formulas from TCGA to glioblastoma patients from REMBRANDT database. Consistent with TCGA results, our *RNDI*^{low} signature predicts survival of glioblastoma patients (figure 5F). Using TCGA, a multivariate cox regression analysis with clinical parameters was carried out to test the strength of *RNDI*^{low} signature in its ability to predict survival. This analysis showed that our *RNDI*^{low} signature remains a strong prognostic factor, independently of clinical parameters (table 1, $p=0.0042$). To conclude,

we identified an *RND1*^{low} signature that is an independent prognostic factor in glioblastoma.

Discussion:

The aim of this work was to establish whether GSC migration heterogeneity exists according to the initial location of these cells within the tumor (PVZ+ or PVZ-). By using an original model of GSCs isolated from CT and PVZ, we demonstrated that PVZ GSCs migrated faster than CT GSCs and, that their migration was controlled by *RND1*. Moreover, we demonstrated that low-expression of *RND1* in glioblastoma patient samples was correlated with a worse prognosis for patients. Finally, we identified an *RND1*^{low} signature that predicts outcome for glioblastoma patients.

A key finding of our pilot study is that the migration properties of GSCs depend on their anatomical location. This work will be the foundation for further studies, with a larger number of patients, but shows the increased migration ability of PVZ GSCs compared to CT-derived cells. The increased migration ability of PVZ GSCs could explain the worse clinical outcome of PVZ+ patients. Only a few studies have previously described different GSC migration abilities according to their location. In fact, a GSC line derived from the PVZ, injected into a mouse brain was shown to invade the corpus callosum and the contralateral hemisphere whereas a GSC line derived from CT was not able to invade these sites [27]. More recently, it has been shown that the GSCs from peritumoral parenchyma are much more invasive than the GSCs from the tumor mass [28]. As CT and PVZ samples come from the same patient, our study illustrates the importance of the intratumor heterogeneity on tumor behavior. In this study, we investigated and identified genes that

may distinguish CT and PVZ cells. These genes are involved in cell migration, metabolism, transcription, translation, intracellular traffic, regulation of apoptosis and cell survival (supplementary table 1). A recent study analyzed proteins that are significantly altered in PVZ+/PVZ- tissues of glioblastoma patients [29]. In accordance to our results, they found that pathways involved in metabolism, notably in oxidative phosphorylation, and extracellular matrix receptor interaction, migration are affected in PVZ+ glioblastoma. All these functions are hallmarks of cancer and open new lines of research to explain the higher resistance to treatment and the poor overall survival of PVZ+ patients.

Besides this, we demonstrated in our GSC model that the higher migration ability of PVZ GSCs is due to lower levels of *RND1*. Only four recent studies explored the role of RND1 in cell migration. Consistent with our present data, inactivation of RND1 induces the invasion of immortalized breast cells in 3D matrigel and, overexpression of RND1 diminishes lung colonization in mice xenografted with breast cancer cells [30]. On the contrary, overexpression of RND1 in esophageal carcinoma cells promotes their migration [31]. This discrepancy concerning the role of RND1 in invasion is correlated with the difference of *RND1* misregulation in these cancers. In fact, *RND1* expression is down-regulated in glioblastoma patients and in the most aggressive subtypes of breast cancers [30] but it is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma [31]. Overexpression of RND1 suppresses focal adhesion sites [25] whose formation and turnover are crucial for cell migration [32]. It is known that there is a bi-phasic migration response to cell adhesion since both too weak and too strong adhesion can reduce cell migration [33]. Our functional enrichment of genes in patients revealed that low expression of *RND1* in glioblastoma induces an overexpression of focal adhesion proteins like extracellular matrix proteins

(*COL1A1* and *LAMB1*); integrins (*ITGA5* and *ITGB1*); actin-binding proteins (*FLNA*; *ACTN1*) and vinculin (supplementary table 4). Moreover, it was previously shown that overexpression of *RND1* in fibroblasts decreases the expression of vinculin [25]. We could hypothesize that misregulation of *RND1* expression in glioblastoma cells leads to an optimal formation and turnover of focal adhesion sites and therefore, increased migration.

Recurrence of glioblastoma is caused by the combination of local invasion and therapy resistance. Using a data-driven approach, it has been recently demonstrated that expression of RhoGTPases is a key marker of glioma progression [26]. In fact, the overexpression of *RND3*, another member of *RND* subfamily, enhances the invasion of glioblastoma and is correlated with a poor prognosis. For its parts, in response to a protein complex containing pleiotrophin, secreted by neural precursor from the PVZ, RhoA signaling is activated in glioma cells and induces the migration of glioma cells to the PVZ [34]. In this study, we showed that low levels of *RND1*, involved in GSC migration, are also related to a decreased overall survival in patients. Moreover, we found that patients with an underexpression of *RND1* mostly belong to the mesenchymal subtype. The mesenchymal subtype in glioma is defined by a genomic and transcriptomic profile, notably by lower *NF1* expression levels and higher expression levels of mesenchymal markers such as *CHI3L1/YKL40* and *MET* [35, 36]. The mesenchymal subtype is associated with a poorer survival in patients with glioblastoma than other groups [37, 38]. All these results raise the question whether loss of *RND1* is the cause or consequence of the mesenchymal subtype. Depletion of *RND1* in immortalized mammary epithelial cells promotes epithelial to mesenchymal transition associated notably with disruption of adherens junctions, downregulation of E-cadherin and up-regulation of fibronectin [30].

This result in breast is in favor of the hypothesis that loss of *RND1* induces a mesenchymal phenotype. Further investigations are required to fully answer this question in glioblastoma.

Based on functional enrichment of genes in patients with low expression of *RND1*, we identified six genes whose expression is inversely correlated to *RND1* and that predict the survival of glioblastoma patients. The *RND1*^{low} signature gathered three qualities: it was discovered from a homogeneous population of glioblastoma patients treated with standard radio-chemotherapy; it involves a short list of genes; and it remains a good prognostic factor, independently of clinical parameters. Moreover, the predictive power of the *RND1*^{low} signature remains significant for both the training (TCGA) and validation sets (REMBRANDT). Thanks to these qualities, the *RND1*^{low} signature could be useful in clinical practice to predict the survival of glioblastoma patients. The *RND1*^{low} signature could also lead to clinical application to improve glioblastoma treatment through the targeting of genes involved in this signature. Indeed, *ITGA5* and *MET* were found to be key contributors to the *RND1*^{low} signature with their high BSS (supplementary table 5). Integrin $\alpha5\beta1$ has recently been described as a fine regulator of glioblastoma cell migration [39]. *MET* and its ligand HGF create an autocrine signaling loop that promotes GSC invasion [40]. In consequence, targeting *ITGA5* or *MET* genes could inhibit the invasive capacity of glioblastoma cells induced by low *RND1* expression and especially the one of PVZ+ cells.

Materials and Methods:

Extracellular matrix proteins, antibodies and primers.

Extracellular matrix proteins, antibodies and primers are respectively depicted in supplementary tables 6, 7 and 8. As previously described [30], commercial antibodies did not show sufficient affinity to allow the detection of endogenous RND1.

Tumor samples.

Before any therapy, GB samples were obtained after informed consent from patients admitted to the neurosurgery department at Toulouse University Hospital. Tumors were histologically diagnosed as glioblastoma according to WHO criteria. For patients 1 and 2, two tumor samples were removed from the cortical area (CT1, CT2) and from the periventricular zone (PVZ1 and PVZ2). These patients had a large tumor that was in contact with both CT and PVZ. For other patients (A1, G, I, K, SC1, SC3), only one tumor sample was removed from different brain zones.

Cell culture and limiting dilution assays.

Using the neurosphere assay, GB primary cell lines were obtained from GB samples and grown in stem cell medium (GSM) as previously described [22]. The percentage of GSCs was evaluated by flow cytometry [22] (supplementary table 9). Limiting dilution assays were performed on GSCs [22]. For cell differentiation, GSCs were grown in DMEM-F12 supplemented with 10% FCS (FCSM) for two weeks [22].

Human LN18, U87, U138, U251, SF763 and SF767 glioblastoma cells were maintained in DMEM (Lonza) supplemented with 10% FCS.

Cell transfection, cell sorting and cell transduction

Five hundred thousand PVZ1 cells per well were seeded in 6-well plates and then transfected using Fugene HD (Promega) with three μ g of p-EGFP-*RND1* (Addgene) or of p-EGFP (Clontech). A second transfection was realized seven days after the first transfection to improve gene expression. One week after the second transfection, GFP-positive or GFP-negative GSCs were sorted by FACS. Sorted GSCs were immediately

seeded on culture plates to study their ability to migrate or pelleted to quantify *RND1* mRNA expression levels. Twenty five hundred thousand CT1 cells were transduced with lentiviral particles (MOI of 10:1) containing the pLK0.1-neo-CMVtGFP-shRNA plasmid with a sequence directed against *RND1* mRNA or a control sequence (Sigma-Aldrich). Five days after transduction, transduced cells were selected with G418.

RT-qPCR and differential expression analysis

RNA from normal human cortex and white matter were obtained from Biochain, Origene, Clontech, and Agilent. Total RNA extraction, RT-qPCR protocol and ΔC_t analysis were previously described [22]. Beta2 microglobulin or actin was used as endogenous control in the ΔC_t analysis.

After RT on GSCs RNA (at least three samples per cell line) with biotinylated deoxyribonucleotides, cDNA were hybridized on an Affymetrix Human Gene 2.0 ST array. Then, the DNA complexes were revealed by fluorescent streptavidin. Images were analyzed by Command Console and normalized with RMA method (data were normalized per cell line). Two lists of differentially expressed genes (CT1 vs PVZ1 and CT2 vs PVZ2) were established using a criteria based on adjusted *p*-value cut off of 0.001 and log₂ fold change >0.65 or <-0.65. In the heatmap, we only showed the differentially expressed genes that were common to both lists and had the same directional change.

Orthotopic xenograft generation and immunohistochemistry

In accordance with ARRIVE guidelines, the French Institution animal ethics committee approval was obtained for the protocols used on animals. Orthotopic human GB xenografts were established in 4-6 weeks-old female nude mice (Janvier) with 2.5×10^5 cells as previously described [22]. Each GSC line was xenografted at least in three mice. Immunohistochemistry analysis was performed on the excised brains on paraffin-embedded sections (5 μ m) [22].

Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed as previously described [41]. For nestin and sox2 stainings, isolated GSCs were seeded on laminin-coated Labtek slides for 24 hours. For β 3-tubulin and GFAP stainings, GSC neurospheres were seeded on laminin-coated Labtek slides and were grown in FCSM for five days.

Cell spreading assays

Fifteen thousand GSCs were seeded on pre-coated wells with extracellular matrix proteins at $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and incubated at 37°C . When mentioned, GSCs were pre-incubated or not with $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ of function-blocking antibodies for 30 min at 37°C . Three random fields per well from duplicate wells were pictured under a 10 X objective. Cells were manually delineated. Cell surface (A), perimeter (P) and circularity ($C=4\pi(A/P^2)$) of at least 30 cells per experiment were calculated using the NIS-Elements Advanced Research 3.0 software (Nikon). Cells were classified into two groups: rounded cells and polarized cells as previously described [42].

Directional migration assays

Directional migration assays were performed as previously described [41] except for the following: twenty thousand GSCs per well were seeded in Transwells (24 wells, BD Biosciences) pre-coated on their undersurface with indicated extracellular matrix proteins and incubated for 24 h at 37°C .

Non-directional migration assays

GSCs (0.75×10^4 cells/ cm^2) were seeded on laminin-coated wells (2 duplicate wells per condition) and were allowed to migrate for 4 h at 37°C , 5% CO_2 . Using an inverted Nikon microscope at 10x magnification, two fields per well were imaged and followed at 3 min intervals with a Coolsnap HQ camera (Photometrics, Tucson, AZ). Manual tracking of the nucleus was performed to follow individual cell migration (at least 30 individual cells per

condition per experiment) using NIS-Elements AR 3.0 software as previously described [43].

Flow cytometry

Flow cytometry was performed as previously described [44]. To specifically determine integrin expression in GSCs, the gated strategy was based on the previously described protocol [22].

***RND1* gene expression meta-analysis, survival analysis and functional enrichment**

For the meta-analysis of *RND1* gene expression, we selected the thirteen gene expression datasets (depicted in supplementary table 10) comparing glioblastoma samples to normal tissues available on the NextBio research browser (<http://www.nextbio.com/>) [45]. For survival analysis, using the glioblastoma database of TCGA (<http://genome-cancer.ucsc.edu/>), we focused on patients treated with standard radio-chemotherapy for primary GB, excluding patients with prior glioma history (n=184 patients). Minimum *p*-value approach was used to dichotomize *RND1* expression (if *RND1*>4.8). Overall survival rates were estimated using Kaplan-Meier method and univariate analysis were performed using logrank test. Two-sided *p*-values of less than 0.05 were considered statistically significant. Using TCGA, two thousand genes that are the most differentially expressed in patients with low and high *RND1* expression were identified by Student's t-test on all available TCGA patients. The *p*-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg procedure for multiple testing [46]. These genes (*p*-value cut off of 0.01 and log2 fold change>1.1 or <0.909) were then analyzed for functional enrichment using the Cytoscape (version 3.4.0) plugin ClueGO (version 2.2.5) [47] compared to the KEGG term. A lasso penalized cox regression was used to identify correlations between overall survival and *RND1*, genes from (KEGG_ECM_RECEPTOR) and (KEGG_FOCAL_ADHESION) pathways [48]. A 10-fold cross validation was realized to select the best penalty parameter lambda. Using a resampling approach, bootstrap selection stability (BSS) was computed for each parameter. From genes selected by the lasso procedure, a risk score prediction was created. It is based on the linear predictor given by the model. This score was then

dichotomized by taking the median value of the risk score (threshold=2.28). Thus, two groups were established (poor versus good prognostic) and corresponded to the signature for this dataset. To validate our signature, the training model obtained from TCGA was then applied on glioblastoma patients (n=178) from REMBRANDT database (<http://www.betastasis.com/>) and a new risk score was obtained. The risk score was dichotomized like mentioned above, by taking the median value of the new risk score (threshold=3.15).

Statistical analysis

To compare the average from different experiments, Student's test was used. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$; risk of 5 %.

Acknowledgements :

The ARC foundation, Fondation de France and ITMO Cancer; ITMO Cancer and Region Midi-Pyrenees/INSERM supported Sabrina Boyrie, Laure Malric and Laetitia Mouly respectively. We thank Judith Martinez Gala, Manon Farce and Anne-Laure Iscache for their kind technical assistance. We also thank the department of pathology of Claudius Regaud Institute; Jean-José Maoret; Lidwine Trouilh and Sophie Lamarre from GenoToul for their kind help in the analysis of microarrays.

References:

1. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 459-66. doi: S1470-2045(09)70025-7 [pii] 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
2. Konishi Y, Muragaki Y, Iseki H, Mitsuhashi N, Okada Y. Patterns of intracranial glioblastoma recurrence after aggressive surgical resection and adjuvant management: retrospective analysis of 43 cases. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2012; 52: 577-86. doi: DN/JST.JSTAGE/nmc/52.577 [pii].
3. Meyer M, Reimand J, Lan X, Head R, Zhu X, Kushida M, Bayani J, Pressey JC, Lionel AC, Clarke ID, Cusimano M, Squire JA, Scherer SW, et al. Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112: 851-6. doi: 10.1073/pnas.1320611111.
4. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suva ML, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science.* 2014; 344: 1396-401. doi: 10.1126/science.1254257.
5. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, Morozova O, Newton Y, Radenbaugh A, Pagnotta SM, Anjum S, Wang J, Manyam G, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell.* 2016; 164: 550-63. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.028.
6. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C, Tavare S. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110: 4009-14. doi: 1219747110 [pii] 10.1073/pnas.1219747110.
7. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003; 63: 5821-8. doi:
8. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 2006; 444: 756-60. doi: nature05236 [pii] 10.1038/nature05236.
9. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 2006; 5: 67. doi: 1476-4598-5-67 [pii] 10.1186/1476-4598-5-67.
10. Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature.* 2012; 488: 522-6. doi: nature11287 [pii] 10.1038/nature11287.

11. Schonberg DL, Lubelski D, Miller TE, Rich JN. Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy. *Mol Aspects Med.* 2013; 39: 82-101. doi: S0098-2997(13)00044-7 [pii]
10.1016/j.mam.2013.06.004.
12. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432: 396-401. doi: nature03128 [pii]
10.1038/nature03128.
13. Qiu B, Zhang D, Tao J, Tie X, Wu A, Wang Y. Human brain glioma stem cells are more invasive than their differentiated progeny cells in vitro. *J Clin Neurosci.* 2011; 19: 130-4. doi: S0967-5868(11)00440-1 [pii]
10.1016/j.jocn.2011.06.014.
14. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5: 816-26. doi: 10.1038/nrm1490
nrm1490 [pii].
15. Uhm JH, Gladson CL, Rao JS. The role of integrins in the malignant phenotype of gliomas. *Front Biosci.* 1999; 4: D188-99. doi:
16. Janouskova H, Maglott A, Leger DY, Bossert C, Noulet F, Guerin E, Guenot D, Pinel S, Chastagner P, Plenat F, Entz-Werle N, Lehmann-Che J, Godet J, et al. Integrin alpha5beta1 plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Res.* 2012; 72: 3463-70. doi: 0008-5472.CAN-11-4199 [pii]
10.1158/0008-5472.CAN-11-4199.
17. Lathia JD, Gallagher J, Heddleston JM, Wang J, Eyler CE, Macsworlds J, Wu Q, Vasanji A, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010; 6: 421-32. doi:
18. Nakada M, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Takino T, Hayashi Y, Sato H, Sai Y, Tsuji T, Miyamoto KI, Hirao A, Hamada JI. Integrin alpha3 is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *Br J Cancer.* 2013; 108: 2516-24. doi: bjc2013218 [pii]
10.1038/bjc.2013.218.
19. Adeberg S, Konig L, Bostel T, Harrabi S, Welzel T, Debus J, Combs SE. Glioblastoma recurrence patterns after radiation therapy with regard to the subventricular zone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014; 90: 886-93. doi: S0360-3016(14)03534-2 [pii]
10.1016/j.ijrobp.2014.07.027.
20. Jafri NF, Clarke JL, Weinberg V, Barani IJ, Cha S. Relationship of glioblastoma multiforme to the subventricular zone is associated with survival. *Neuro Oncol.* 2013; 15: 91-6. doi: nos268 [pii]
10.1093/neuonc/nos268.
21. Khalifa J. TF, Lusque A, Plas B, Lotterie JA, Benouaich-Amiel A, Uro-Coste E, Lubrano V, Cohen-Jonathan Moyal E. Subventricular zones: new key targets for glioblastoma treatment. *Radiation Oncology.* 2017; 12: 67. doi:
22. Dahan P, Martinez Gala J, Delmas C, Monferran S, Malric L, Zentkowski D, Lubrano V, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E, Lemarie A. Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death Dis.* 2014; 5: e1543. doi: cddis2014509 [pii]

10.1038/cddis.2014.509.

23. Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 1046-69. doi: 10.1016/j.biocel.2004.01.013

S1357272504000214 [pii].

24. Delamarre E, Taboubi S, Mathieu S, Berenguer C, Rigot V, Lissitzky JC, Figarella-Branger D, Ouafik L, Luis J. Expression of integrin $\alpha 6 \beta 1$ enhances tumorigenesis in glioma cells. *Am J Pathol.* 2009; 175: 844-55. doi: S0002-9440(10)60596-2 [pii] 10.2353/ajpath.2009.080920.

25. Nobes CD, Lauritzen I, Mattei MG, Paris S, Hall A, Chardin P. A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol.* 1998; 141: 187-97. doi:

26. Clarke K, Daubon T, Turan N, Soulet F, Mohd Zahari M, Ryan KR, Durant S, He S, Herbert J, Ankers J, Heath JK, Bjerkvig R, Bicknell R, et al. Inference of Low and High-Grade Glioma Gene Regulatory Networks Delineates the Role of Rnd3 in Establishing Multiple Hallmarks of Cancer. *PLoS Genet.* 2015; 11: e1005325. doi: 10.1371/journal.pgen.1005325

PGENETICS-D-14-03342 [pii].

27. Tchoghandjian A, Baeza-Kallee N, Beclin C, Metellus P, Colin C, Ducray F, Adelaide J, Rougon G, Figarella-Branger D. Cortical and subventricular zone glioblastoma-derived stem-like cells display different molecular profiles and differential in vitro and in vivo properties. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19 Suppl 3: S608-19. doi: 10.1245/s10434-011-2093-5.

28. Ruiz-Ontanon P, Orgaz JL, Aldaz B, Elosegui-Artola A, Martino J, Berciano MT, Montero JA, Grande L, Nogueira L, Diaz-Moralli S, Esparis-Ogando A, Vazquez-Barquero A, Lafarga M, et al. Cellular plasticity confers migratory and invasive advantages to a population of glioblastoma-initiating cells that infiltrate peritumoral tissue. *Stem Cells.* 2013; 31: 1075-85. doi: 10.1002/stem.1349.

29. Gollapalli K, Ghantasala S, Kumar S, Srivastava R, Rapole S, Moiyadi A, Epari S, Srivastava S. Subventricular zone involvement in Glioblastoma - A proteomic evaluation and clinicoradiological correlation. *Sci Rep.* 2017; 7: 1449. doi: 10.1038/s41598-017-01202-8.

30. Okada T, Sinha S, Esposito I, Schiavon G, Lopez-Lago MA, Su W, Pratilas CA, Abele C, Hernandez JM, Ohara M, Okada M, Viale A, Heguy A, et al. The Rho GTPase Rnd1 suppresses mammary tumorigenesis and EMT by restraining Ras-MAPK signalling. *Nat Cell Biol.* 2014; 17: 81-94. doi: ncb3082 [pii] 10.1038/ncb3082.

31. Xiang G, Yi Y, Weiwei H, Weiming W. RND1 is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma and promotes the growth and migration of cancer cells. *Tumour Biol.* 2015. doi: 10.1007/s13277-015-3855-7.

32. O'Neill GM. The coordination between actin filaments and adhesion in mesenchymal migration. *Cell Adh Migr.* 2009; 3: 355-7. doi: 9468 [pii].

33. Huttenlocher A, Ginsberg MH, Horwitz AF. Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J Cell Biol.* 1996; 134: 1551-62. doi:

34. Qin EY, Cooper DD, Abbott KL, Lennon J, Nagaraja S, Mackay A, Jones C, Vogel H, Jackson PK, Monje M. Neural Precursor-Derived Pleiotrophin Mediates Subventricular Zone Invasion by Glioma. *Cell*. 2017; 170: 845-59 e19. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.016.
35. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006; 9: 157-73. doi: 10.1016/j.ccr.2006.02.019.
36. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010; 17: 98-110. doi: S1535-6108(09)00432-2 [pii] 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
37. Bhat KPL, Balasubramaniyan V, Vaillant B, Ezhilarasan R, Hummelink K, Hollingsworth F, Wani K, Heathcock L, James JD, Goodman LD, Conroy S, Long L, Lelic N, et al. Mesenchymal differentiation mediated by NF-kappaB promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2013; 24: 331-46. doi: 10.1016/j.ccr.2013.08.001.
38. Ke Y, Han Y, Guo X, Wen J, Wang K, Jiang X, Tian X, Ba X, Boldogh I, Zeng X. Erratum: PARP1 promotes gene expression at the post-transcriptional level by modulating the RNA-binding protein HuR. *Nat Commun*. 2017; 8: 15191. doi: 10.1038/ncomms15191.
39. Blandin AF, Noulet F, Renner G, Mercier MC, Choulier L, Vauchelles R, Ronde P, Carreiras F, Etienne-Selloum N, Vereb G, Lelong-Rebel I, Martin S, Dontenwill M, et al. Glioma cell dispersion is driven by alpha5 integrin-mediated cell-matrix and cell-cell interactions. *Cancer Lett*. 2016; 376: 328-38. doi: S0304-3835(16)30220-8 [pii] 10.1016/j.canlet.2016.04.007.
40. Joo KM, Jin J, Kim E, Ho Kim K, Kim Y, Gu Kang B, Kang YJ, Lathia JD, Cheong KH, Song PH, Kim H, Seol HJ, Kong DS, et al. MET signaling regulates glioblastoma stem cells. *Cancer Res*. 2012; 72: 3828-38. doi: 0008-5472.CAN-11-3760 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-11-3760.
41. Monferran S, Paupert J, Dauvillier S, Salles B, Muller C. The membrane form of the DNA repair protein Ku interacts at the cell surface with metalloproteinase 9. *EMBO J*. 2004; 23: 3758-68. doi: 10.1038/sj.emboj.7600403 7600403 [pii].
42. Sadok A, Bourgarel-Rey V, Gattacceca F, Penel C, Lehmann M, Kovacic H. Nox1-dependent superoxide production controls colon adenocarcinoma cell migration. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1783: 23-33. doi: S0167-4889(07)00247-9 [pii] 10.1016/j.bbamcr.2007.10.010.
43. Taboubi S, Garrouste F, Parat F, Pommier G, Faure E, Monferran S, Kovacic H, Lehmann M. Gq-coupled purinergic receptors inhibit insulin-like growth factor-I/phosphoinositide 3-kinase pathway-dependent keratinocyte migration. *Mol Biol Cell*. 2010; 21: 946-55. doi: E09-06-0497 [pii] 10.1091/mbc.E09-06-0497.

44. Monferran S, Skuli N, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Cohen-Jonathan-Moyal E, Toulas C. Alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int J Cancer*. 2008; 123: 357-64. doi: 10.1002/ijc.23498.
45. Kupersmidt I, Su QJ, Grewal A, Sundaresh S, Halperin I, Flynn J, Shekar M, Wang H, Park J, Cui W, Wall GD, Wisotzkey R, Alag S, et al. Ontology-based meta-analysis of global collections of high-throughput public data. *PLoS One*. 2010; 5. doi: 10.1371/journal.pone.0013066.
46. Benjamini Y HY. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol*. 1995: 289-300. doi:
47. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman WH, Pages F, Trajanoski Z, Galon J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 2009; 25: 1091-3. doi: btp101 [pii] 10.1093/bioinformatics/btp101.
48. Tibshira. The lasso method for selection in the cox model. *Stat Med*. 1997; 16: 385-95. doi:

Figure legends:

Figure 1: Characterization of GSCs derived from CT and PVZ

A. Representative Gadolinium enhanced T1-weighted magnetic resonance imaging showing a right-sided glioblastoma for patient 1 and patient 2. Star symbols mark the location of the extracted tissue sample from the CT or the PVZ.

B. RNAs from GSC neurospheres (CT1, PVZ1, CT2 and PVZ2) or from U87, U138, U251, SF767 cells were extracted and then the expression of glioblastoma stem cell markers was analyzed by RT-qPCR as described in Material and Methods. Data is shown as means ($\pm$ SEM) from at least 3 experiments.

C. GSCs were cultured in glioblastoma stem cell medium (GSM) or in medium with 10 % of FCS (FCSM) for two weeks as described in Material and Methods, then RNAs were extracted. The expression of cell differentiation markers (*GFAP*, *TUJ1*, *MAL* and *OMG*) was analyzed by RT-qPCR as described in Material and Methods. Data is the fold inductions expressed as means ($\pm$ SEM) of at least 3 independent experiments compared with the related control (CT and PVZ cultured in GSM).

D. GSCs were plated in 96-well plates at different low cell densities (1 to 250 cells/well) to study their ability to generate secondary neurospheres through limiting dilution assays. The results from 3 experiments are expressed as percentage of positive wells (means $\pm$ SEM).

E. Hematoxylin and eosin staining (left and center panel, center: enlarged pictures: x4) and nestin immunostaining (right panel) of mice brains orthotopically xenografted with GSCs. Dotted lines: core tumor. Arrows: invasive extensions as well as disseminated tumor clusters.

F. Heat map generated from DNA microarray data showing differentially expressed genes between CT and PVZ GSCs: upregulated (red) or down-regulated (green) genes.

Figure 2: Laminin-induced migration is increased in PVZ GSCs

A. GSCs were seeded on plates pre-coated with 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of indicated extracellular matrix proteins and then allowed to spread. Then, phase-contrast photographs were taken under x10 magnification.

B. Twenty thousand GSCs were seeded in the upper reservoir of Transwells coated on their undersurface with $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of fibronectin or laminin. Then, cells were allowed to migrate into the lower chamber for 24 h at 37°C . Migrated cells were fixed, stained with amido black and counted. Left: representative pictures. Right: Data is shown as means ($\pm\text{SEM}$) from 3 experiments performed in duplicate.

C. GSCs were plated on laminin pre-coated wells. Migration of individual cells was recorded by time-lapse videomicroscopy over 4 h at 37°C . Left panel: presentation of 8 different GSC migration paths during 4 h. In each experiment, trajectory of at least 30 individual cells was analyzed. Directional persistence and mean cell velocity were calculated from time-lapse movies as described in Material and Methods. Right panels: Top: One representative experiment of directional persistence. Bottom: Mean cell velocity is expressed as means ($\pm\text{SEM}$). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.02$.

Figure 3: RND1 is down-regulated in PVZ GSCs in comparison to CT GSCs

A. Expression of $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins in GSCs by RT-qPCR. Data is shown as means ($\pm\text{SEM}$) from at least 3 experiments.

B. Expression of $\alpha 6$, $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins in CT1 and PVZ1 by FACS. Grey profiles: isotypic control. Black profiles: specific integrin antibody.

C. CT1 or PVZ1 GSCs were pre-incubated with $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ of function-blocking antibody against $\alpha 6$ subunit ($\alpha 6$) or isotypic control (IgG) for 30 minutes at 37°C . Cell spreading was assessed on laminin. Top: representative pictures are shown. Bottom: data is shown as means ($\pm\text{SEM}$) from at least 3 experiments.

D. RNAs from GSC neurospheres (at least 3 different samples per cell line) were extracted and then, differential expression analysis was performed on an Affymetrix Human Gene 2.0 ST array as described in Material and Methods. Data is shown as means of mRNA expression of indicated gene normalized with the RMA method.

E. RNAs from GSC neurospheres were extracted and then, the expression of *RND1* was analyzed by RT-qPCR as described in Material and Methods. Data is shown as means ($\pm\text{SEM}$) from at least 3 experiments. *, $p < 0.05$; ****, $p < 0.001$.

Figure 4: RND1 suppresses spreading and migration abilities of GSCs

A. PVZ1 GSCs were transfected with a plasmid encoding a fusion protein of EGFP and RND1 (PVZ1-RND1 cells). After cell sorting, RNAs from GFP positive and negative PVZ1-RND1 cells were extracted and then, the expression of *RND1* was analyzed by RT-qPCR as described in Material and Methods.

B. GFP negative (GFP-) and GFP positive (GFP+) PVZ1-RND1 cells were seeded on laminin pre-coated plates then allowed to spread for 3 h. Phase-contrast photographs were taken under x10 magnification.

C. Twenty thousand GFP negative (GFP-) or positive (GFP+) PVZ1-RND1 cells were seeded in the upper reservoir of Transwells coated on their undersurface with 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of laminin and then, the cells allowed to migrate into the lower chamber for 24 h at 37°C. Migrated cells were fixed, stained with amido black and counted. Data shown as means ($\pm$ SEM) from 3 experiments performed in duplicate.

D. CT1 were transduced with lentiviral particles expressing a shRNA directed against RND1 (CT1 sh*RND1*) or a control shRNA (CT1 shC). RNAs from stably transduced CT1 shC and CT1 sh*RND1* cells were extracted and then, the expression of *RND1* was quantified by RT-qPCR as described in Material and Methods. Data is shown as fold induction means ($\pm$ SEM) from 3 experiments.

E. GSCs were plated on laminin pre-coated wells. Migration of individual cells was recorded by time-lapse videomicroscopy over 4 h at 37°C. In each experiment, trajectory of at least 30 individual cells was analyzed. Mean cell velocity was calculated from time-lapse movies as described in Material and Methods. The mean cell velocity of CT1 sh*RND1* is compared to the mean cell velocity of CT1 shC used as a reference. *, $p < 0.05$.

F. Stably transduced CT1 shC and CT1 sh*RND1* cells were seeded on laminin pre-coated plates then allowed to spread for 1 h. In each experiment, the cell surface and the percentage of polarized cells of at least 30 individual cells were analyzed. Bars represent means ($\pm$ SEM) from 3 experiments performed in duplicate; *, $p < 0.05$.

Figure 5: Down-regulation of *RND1* is correlated with a worse prognosis in glioblastoma patients and up-regulates the expression of six genes that establish a prognostic signature for glioblastoma

A. *RNDI* mRNA expression in normal brain tissues, in glioblastoma (GB) cell lines (LN18, U138, SF763, SF767, U251, U87) and in GSCs (A1, CT1, PVZ1, CT2, PVZ2, G, I, K, SC1, SC3) was determined by RT-qPCR as described in Material and Methods. *RNDI* mRNA levels in the white matter were used as a reference of normal brain expression. Data is shown as fold induction means from at least three experiments.

B. *RNDI* mRNA expression fold change in glioblastoma samples compared to normal brain tissues from thirteen gene expression datasets, described in supplemental table 5 (studies A to M; several datasets are available for studies I and K). (at least $p < 0.05$, described in supplementary table 10). This analysis was performed using the online NextbioResearch tools.

C. Kaplan-Meier survival curves for glioblastoma patients with *RNDI* underexpression (black, n=26) or overexpression (grey, n=158), determined with TCGA database. Log rank p -value (down-regulated versus upregulated) = 0.0258.

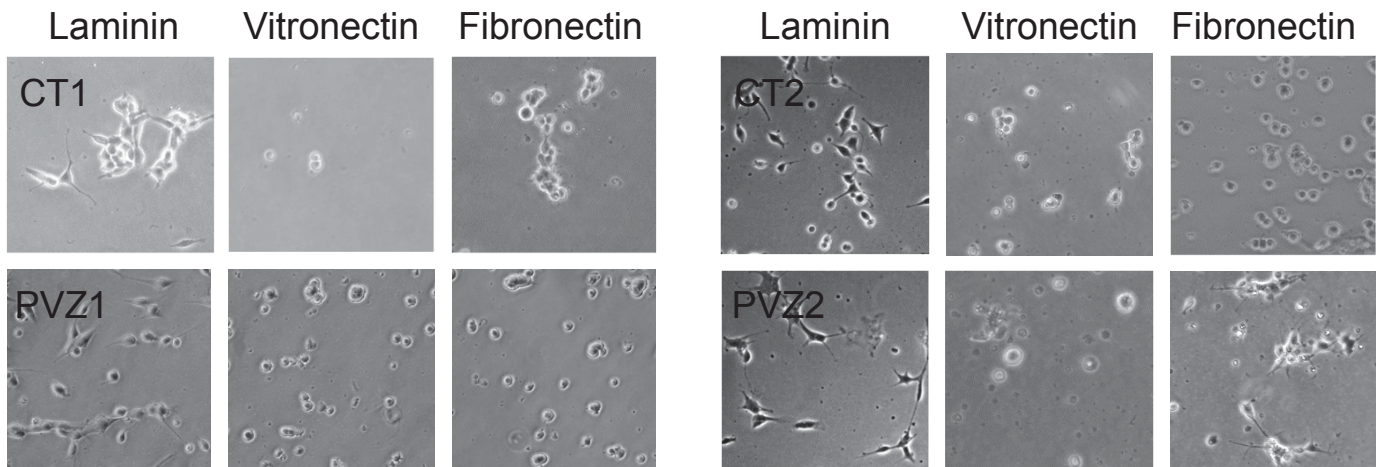
D. Thirteen activating signaling pathways in patients with low *RNDI* expression from KEGG analysis.

E. Analysis of the expression of the six genes that constitute the *RNDI*^{low} signature determined with TCGA database. Data is shown as fold induction means (mRNA expression means of each gene in patients with low levels of *RNDI* relative to patients with high levels of *RNDI*).

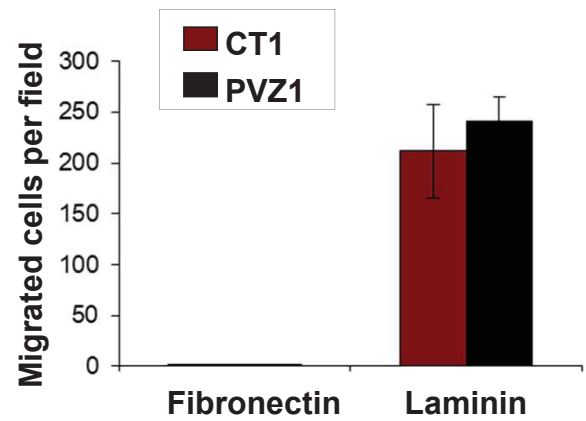
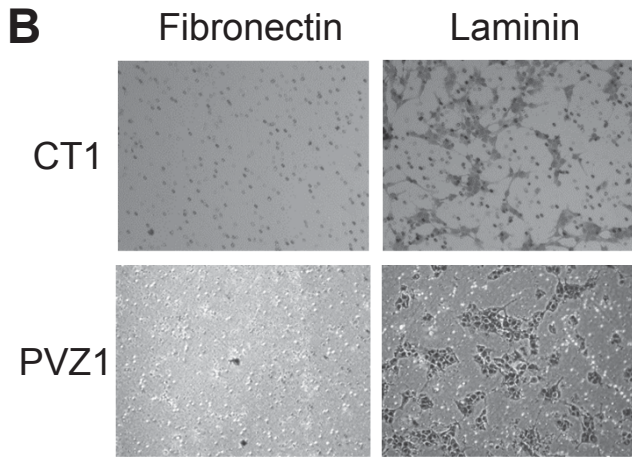
F. Kaplan-Meier survival curves of overall survival in TCGA cohort (top) or in REMBRANDT cohort (bottom) stratified by the *RNDI*^{low} signature high and low risk. TCGA: 92 patients per group. REMBRANDT: 89 patients per group.

Figure 2

A



B



C

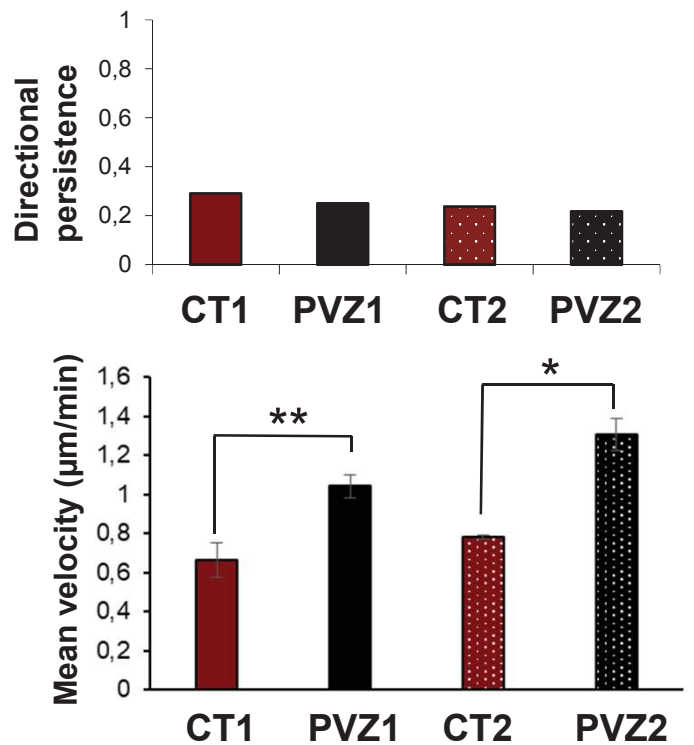
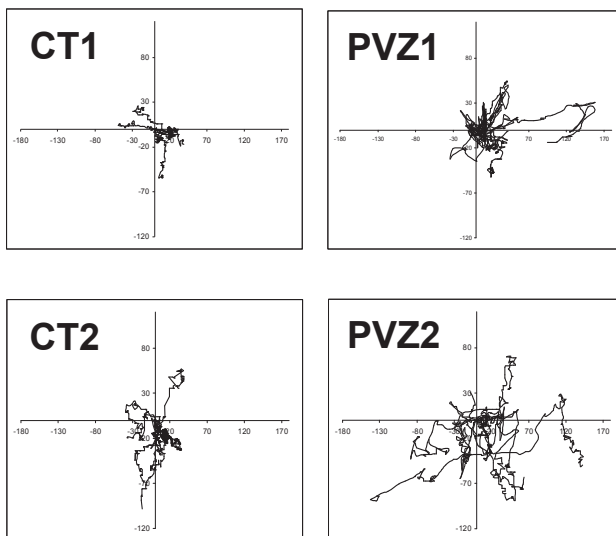


Figure 3

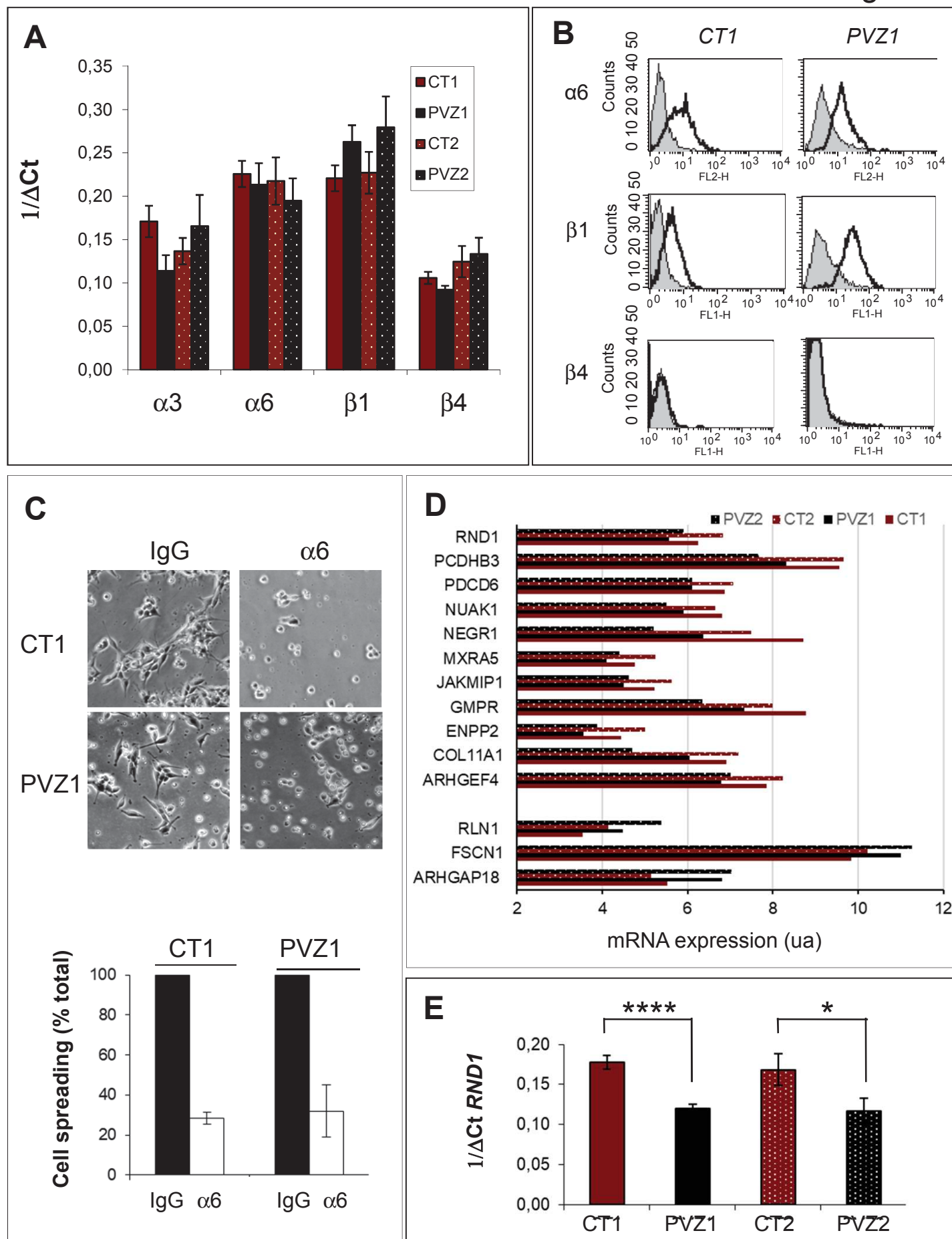


Figure 4

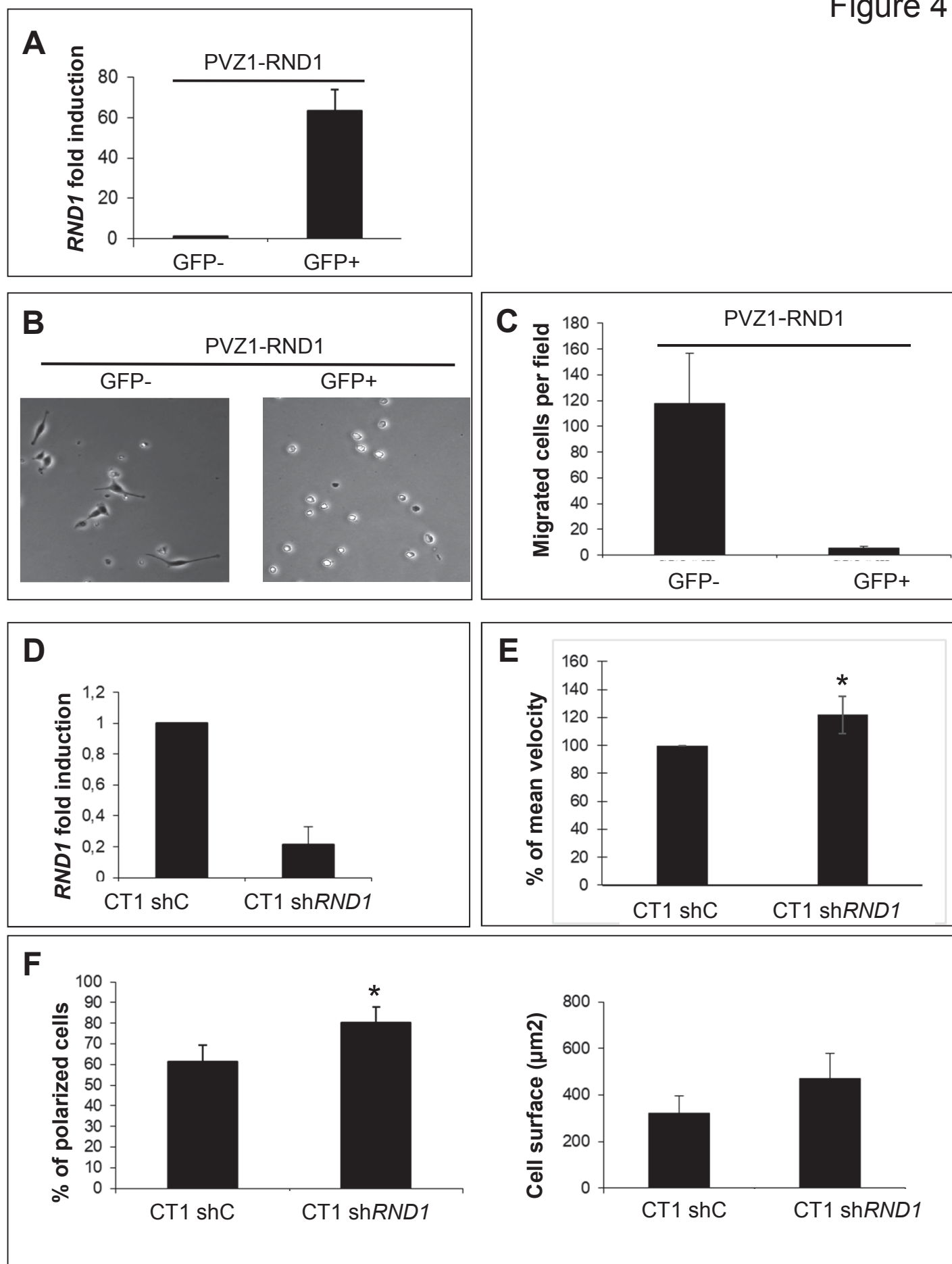
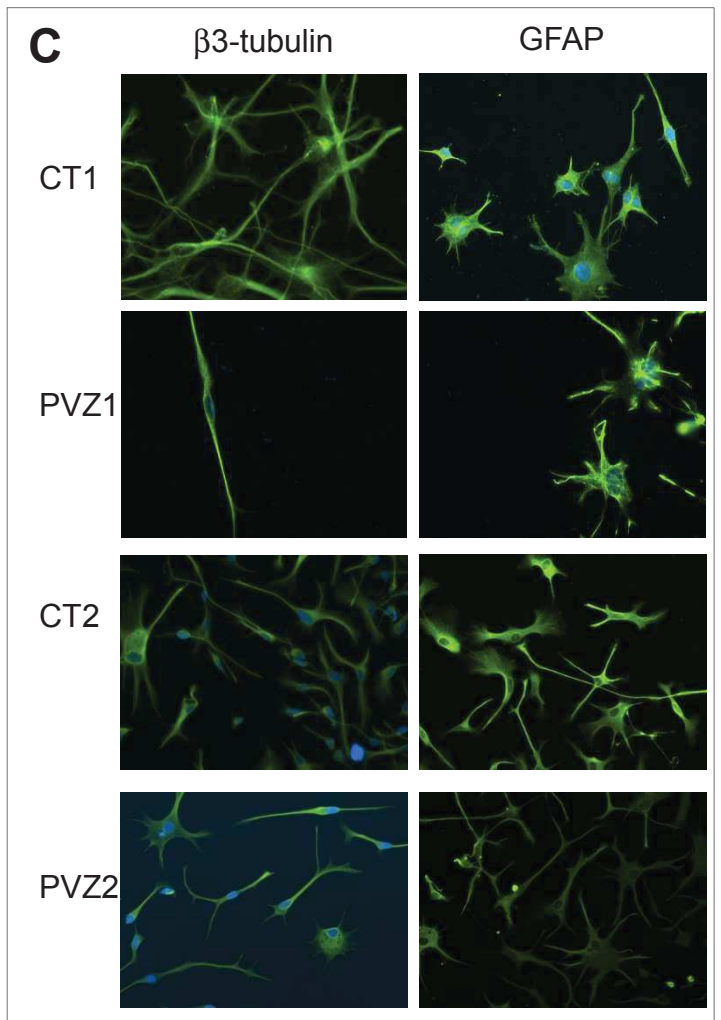
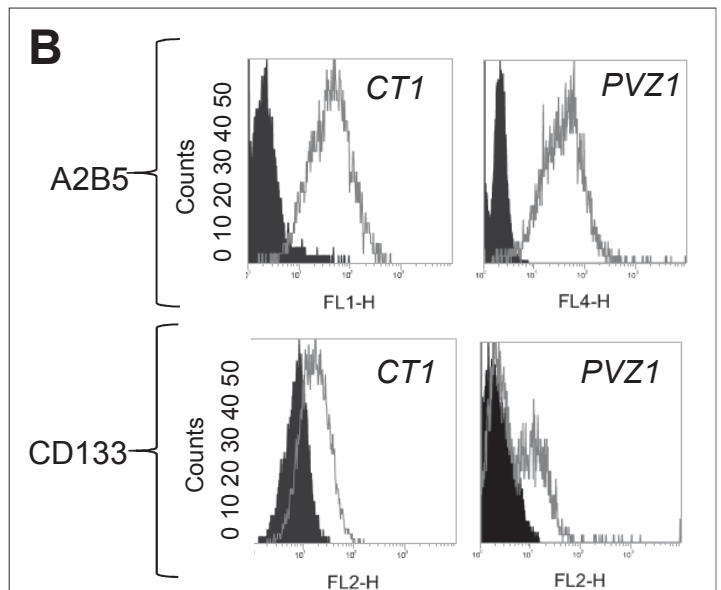
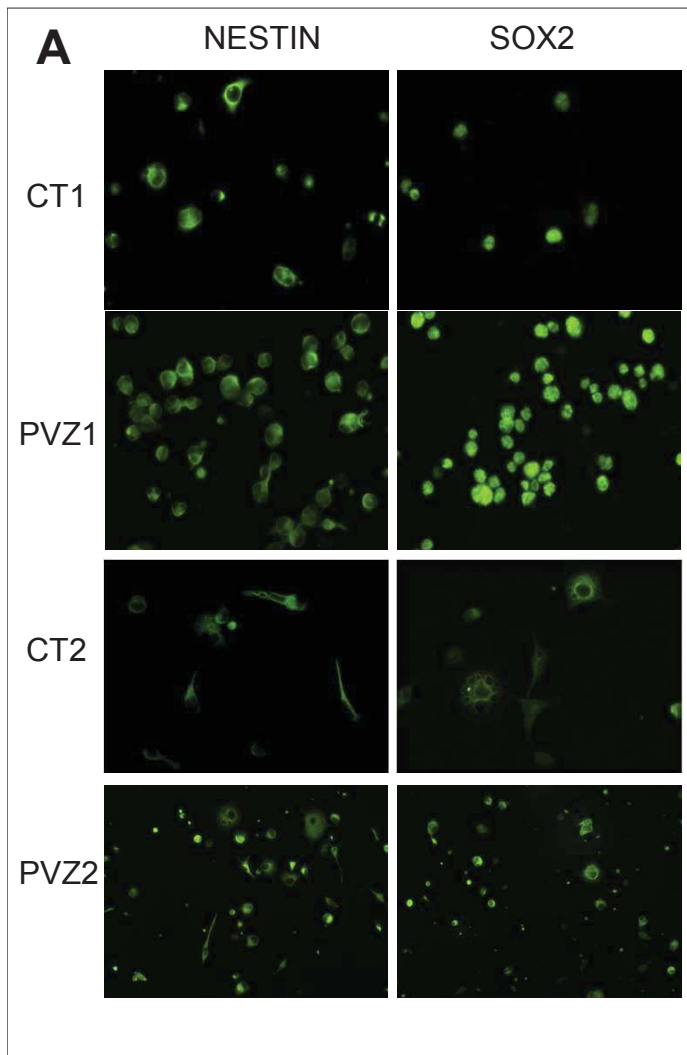


Table 1 : Multivariate cox regression analysis for RND1^{low} signature and other prognostic markers

Factor	HR	p value	IC95%
Risk Score High vs Low	2.22	0.0042	[1.29-3.83]
Karnosky≥70	0.87	0.6643	[0.46-1.63]
Tumor resection vs others	1.85	0.0401	[1.03-3.32]
Age≥60	1.16	0.5459	[0.71-1.91]
Mesenchymal vs Classical	1.49	0.2175	[0.79-2.83]
Neural vs Classical	1.38	0.4012	[0.65-2.90]
Proneural vs Classical	1.58	0.3007	[0.67-3.73]
Non G-CIMP vs G-CIMP	1.20	0.7152	[0.44-3.26]
MGMT methylated vs non methylated	0.50	0.0049	[0.31-0.81]

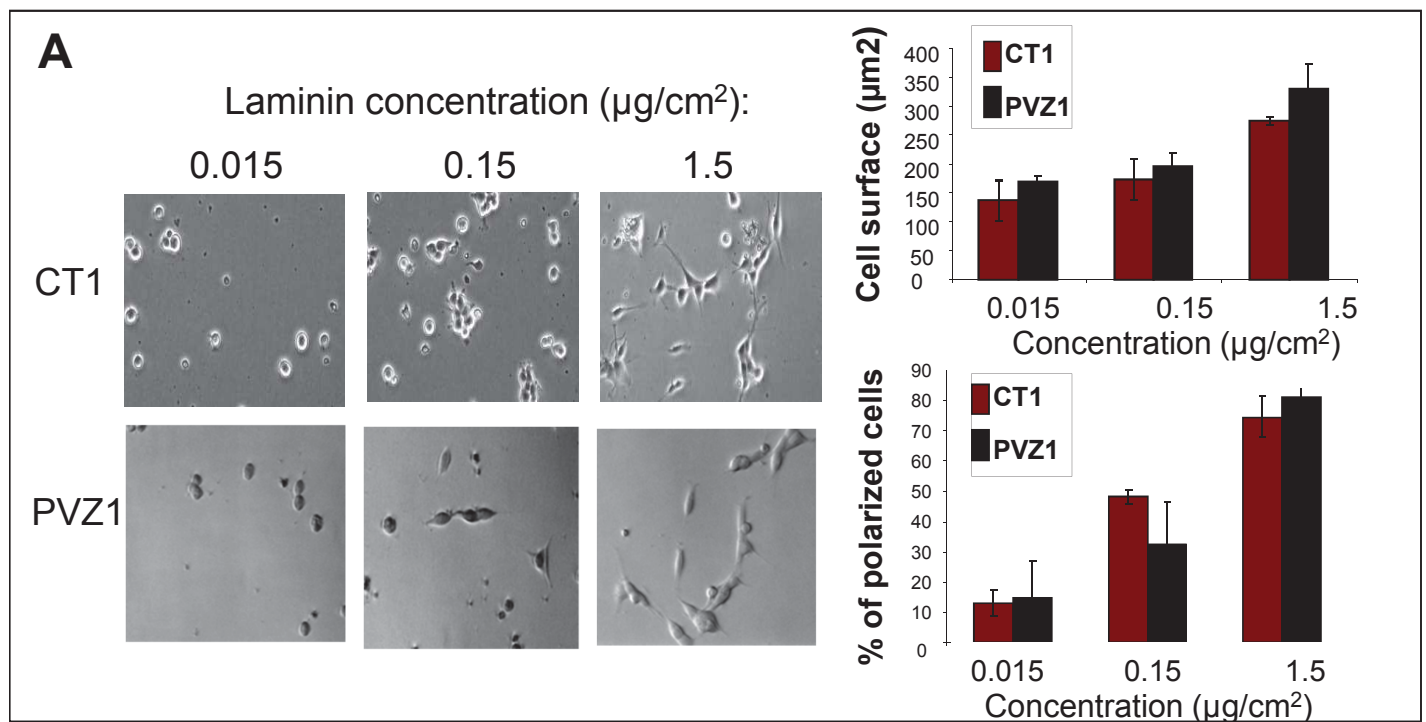


Supplemental figure 1: Characterization of GSCs

A. Representative images of GSCs seeded on laminin-coated coverslips, stained for neural stem cell markers NESTIN and SOX2 (20 X).

B. Representative FACS analysis of neural stem cell markers in GSCs. Black profiles: isotypic controls. Grey profiles: specific neural stem cell markers antibodies.

C. Representative images of GSCs cultured in FCSM for one week which become positive for β 3-tubulin, a neuronal marker, and GFAP, an astrocyte marker (20 X).



Supplemental figure 2: CT and PVZ GSCs spread on laminin

A. CT1 and PVZ1 GSCs were seeded on plates pre-coated with increasing laminin concentrations. Left: two hours after seeding, phase-contrast photographs were taken. Right: in each experiment, cell surface and percentage of polarized cells at least 30 individual cells were quantified as described in Material and Methods. Data is shown as means $\pm$ SD.

Supplementary table 1 : List of genes differentially expressed between CT and PVZ GSCs

Accession number	Gene symbol	Gene name	Average fold change	
			PVZ1/CT1	PVZ2/CT2
Q9UI09	NDUFA12	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	2,29076255	5,27144112
Q13241	KLRD1	Natural killer cells antigen CD94	0,40583617	0,50170897
P36656	DDOST	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	1,71200321	1,73429613
Q16658	FSCN1	Fascin	2,24092835	2,06722736
Q6DHV5	CC2D2B	CC2D2B	0,50424118	0,18870548
A6ND48	OR14I1	Olfactory receptor 14I1	0,55818621	0,39726274
A6ND48	OR4Q3	Olfactory receptor 4Q3	0,52621532	0,54527756
P21399	ACO1	Cytoplasmic aconitate hydratase	1,62081491	2,84229325
O14841	OPLAH	5-oxoprolinase	0,56169873	0,53916906
Q3C1V0	MS4A18	Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 18	0,53728662	0,59379064
Q969E1	LEAP2	Liver-expressed antimicrobial peptide 2	0,47522143	0,49484639
Q9NYD6	HOXC10	Homeobox protein Hox-C10	0,49151125	0,31483845
P08912	CHRM5	Muscarinic acetylcholine receptor M5	1,6467325	1,84627846
Q8N2R0	OSR2	Protein odd-skipped-related 2	0,51509302	0,45048494
Q567U6	CCDC93	Coiled-coil domain-containing protein 93	0,59045878	0,41057642
A6NGD5	ZSCAN5C	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 5C	1,61551906	1,94771368
Q06055	ATP5G2	ATP synthase F(0) complex subunit C2, mitochondrial	0,40277619	0,38971951
O00754	MAN2B1	Lysosomal alpha-mannosidase	1,66683789	1,58525498
Q8NG81	OR2M7	Olfactory receptor 2M7	0,35968679	0,37838435
Q8NGL1	OR5D18	Olfactory receptor 5D18	0,47721795	0,43796967
Q9BXF9	TEKT3	Tektin-3	0,54624041	0,49950341
Q5T871	LELP1	Late cornified envelope-like proline-rich protein 1	0,51004263	0,5579329
Q96A23	CPNE4	Copine-4	3,8603429	7,87842191
Q9Y6Z7	COLEC10	Collectin-10	0,59617926	0,62132472
Q13822	ENPP2	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2	0,54803589	0,46422483
Q06418	TYRO3	Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3	1,64290897	1,77016866
Q9UKX7	NUP50	Nuclear pore complex protein	0,625586113	0,61985432
A6NF36	CCDC182	Coiled-coil domain-containing protein 182	0,53513122	0,46932384
Q8NA19	L3MBTL4	Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 4	3,12141756	3,05498917
P0C7X3	CCNYL3	Putative cyclin-Y-like protein 3	0,5739918	0,62718702
Q8WWZ4	ABCA10	ATP-binding cassette sub-family A member 10	0,49052928	0,48023101
Q6IE36	OVOS2	Ovostatin homolog 2	0,37777412	0,44241733
Q95214	LEPROTL1	Leptin receptor overlapping transcript-like 1	1,79947204	1,68756485
Q5JWF2	GNAS	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms Xlas	0,50749401	0,46741708
Q9AHZ1	CLK4	Dual specificity protein kinase CLK4	0,56528963	0,39222166
Q8WY64	MYLIP	E3 ubiquitin-protein ligase MYLIP	0,39064317	0,24110628
P13647	KRT5	Keratin, type II cytoskeletal 5	0,42242674	0,41057895
Q92903	CDS1	Phosphatidate cytidylyltransferase 1	0,42359885	0,45098062
P28472	GABRB3	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-3	0,62105501	0,63674214
Q14940	SLC9A5	Sodium/hydrogen exchanger 5	0,5794435	0,48465676
Q7Z7K6	CENPV	Centromere protein V	8,44758409	7,07881675
Q5XPU7	TSRM	Zinc finger domain-related protein	0,53634111	0,55181869
Q96GI7	FAM89A	Protein FAM89A	0,56428475	0,4969518
P0C7M3	SFTA3	Protein SFTA3	0,47347324	0,5726791
Q09MP3	RAD51AP2	RAD51-associated protein 2	0,60654103	0,47659422
Q8N392	ARHGAP18	Rho GTPase-activating protein 18	2,44709949	3,72368193
Q9P032	NDUFAF4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 4	0,58263473	0,34103202
Q8N9E0	FAM133A	Protein FAM133A	0,47140419	0,54396006

Q99680	GPR22	Probable G-protein coupled receptor 22	0.54487621	0.63096311
Q95221	OR5F1	Olfactory receptor 5F1	0.56016524	0.53563043
P31270	HOXA11	Homeobox protein Hox-A11	0.60385863	0.59242093
P50395	GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	1.69945816	1.65587456
Q6IMN6	CAPRIN2	Caprin-2	0.55026935	0.62372411
Q9GZU2	PEG3	Paternally-expressed gene 3 protein	1.9875983	2.02407958
A8MTA8	FAM166B	Protein FAM166B	0.55918037	0.62564336
Q6GMV3	PTRHD1	Putative peptidyl-tRNA hydrolase PTRHD1	1.62622186	2.56696373
Q92730	RND1	Rho-related GTP-binding protein	0.62113544	0.52334087
P36959	GMPR	GMP reductase 1	0.36540408	0.31789344
Q8N9A8	CNEP1R1	Nuclear envelope phosphatase-regulatory subunit 1	0.60373263	0.62438674
Q9NR99	MXRA5	Matrix-remodeling-associated protein 5	0.62891806	0.55711083
O14862	AIM2	Interferon-inducible protein AIM2	0.55677972	0.4232845
Q9UKI3	VPREB3	Pre-B lymphocyte protein 3	0.54714893	0.59492218
Q9NX52	RHBDL2	Rhomboid-related protein 2	0.56917451	0.51414941
Q9H2Y9	SLCO5A1	Solute carrier organic anion transporter family member 5A1	0.43446738	0.46111115
Q8NB12	SMYD1	Histone-lysine N-methyltransferase SMYD1	0.29058748	0.08254564
P31943	HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	0.56929283	0.4489809
Q9H2G4	TSPYL2	Testis-specific Y-encoded-like protein 2	0.40482451	0.38697589
Q9NQW5	PRDM7	Probable histone-lysine N-methyltransferase PRDM7	0.63250474	0.384604
E9PAV3	NACA	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	0.56372259	0.5301551
Q5T4H9	CASC10	Protein CASC10	1.67853422	1.72276778
Q9NR80	ARHGEF4	Rho guanine nucleotide exchange factor 4	0.47968667	0.43033135
Q7Z3B1	NEGR1	Neuronal growth regulator 1	0.19718982	0.20464594
Q96DA6	DNAJC19	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14	0.59663109	0.34937782
Q96F63	CCDC97	Coiled-coil domain-containing protein 97	1.73761008	2.0819085
Q8NH00	OR2T4	Olfactory receptor 2T4	0.59685723	0.49370163
Q7RTY0	SLC16A13	Monocarboxylate transporter 13	1.58785218	1.69278806
Q969S9	GFM2	Ribosome-releasing factor 2, mitochondrial	0.62177423	0.40190712
Q8N4B4	FBXO39	F-box only protein 39	0.54751134	0.48699466
Q4KMZ8	NKAIN1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1-interacting protein 1	1.81286865	1.94238909
Q9JBD0	KRBOX1	KRAB domain-containing protein 1	0.62584396	0.54622154
C9UKS7	IKZF2	Zinc finger protein Helios	0.50101828	0.35390896
Q9Y5E6	PCDHB3	Protocadherin beta-3	0.4246379	0.24952098
Q969R8	ITFG2	Integrin-alpha FG-GAP repeat-containing protein 2	0.50589179	0.43976456
P22460	KCNA5	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 5	0.62751662	0.46743049
Q8WUZ0	BCL7C	B-cell CLL/lymphoma 7 protein family member C	1.63116575	2.46457184
P22914	CRYGS	Beta-crystallin S	0.54486749	0.46180977
O75340	PDCD6	Programmed cell death protein 6	0.59348016	0.50815341
Q8TB40	ABHD4	Abhydrolase domain-containing protein 4	1.72364529	1.91415203
Q8TCW7	ZPLD1	Zona pellucida-like domain-containing protein 1	0.61590557	0.59082787
P54803	GALC	Galactocerebrosidase	2.0528392	3.38591026
Q96N16	JAKMIP1	Janus kinase and microtubule-interacting protein 1	0.605853	0.50112074
Q96C10	DHX58	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX58	0.6261584	0.49777991
Q14188	TFDP2	Transcription factor Dp-2	1.68879291	2.13744363
Q8WV37	ZNF480	Zinc finger protein 480	2.40195269	2.66389104
Q8N4F7	RNF175	RING finger protein 175	1.99303743	2.63804003
O14686	KMT2D	Histone-lysine N-methyltransferase 2D	0.63605556	0.57745448
P04808	RLN1	Prorelaxin H1	1.92601556	2.36049227
Q9ULI2	RIMKL8	Beta-citrylglytamate synthase B	0.60095614	0.40248615
P60285	NUAK1	NUAK family SNF1-like kinase 1	0.53528535	0.45050922
Q08623	HDHD1	Pseudouridine-5'-monophosphatase	1.58913061	4.5462385
Q969D9	TSLP	Thymic stromal lymphopoietin	0.53517713	0.49041439
A6NCS6	C2orf72	Uncharacterized protein C2orf72	0.45754783	0.26892356
Q9UIX4	KCNG1	Potassium voltage-gated channel subfamily G member 1	0.58825773	0.52536451
P12107	COL11A1	Collagen alpha-1(XI) chain	0.54549918	0.17948667
H3BPF8	GOLGA8S	Protein GOLGA8S	0.58208614	0.52421146
O43525	KCNQ3	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 3	0.55170245	0.1859066
P14927	UQCRB	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	0.56346436	0.50055717
Q9HAJ7	SAP30L	Histone deacetylase complex subunit SAP30L	0.62967171	0.49061835

Supplementary table 2 : List of non-protein coding RNAs differentially expressed in CT and PVZ GSCs

miRNA	small nucleolar	LINC	antisense	pseudogene	intronic transcript
<i>miR3117</i>	<i>sn RNA C/D box 116-25</i>	<i>LINC01344</i>	<i>AQP4</i>	<i>5S ribosomal pseudogene</i>	<i>ARHGEF9 intronic transcript 1</i>
<i>miR4500 HG</i>	<i>sn RNA C/D box 116-11</i>	<i>LINC01350</i>	<i>C3orf67</i>	<i>amine oxidase, copper containing 4, pseudogene</i>	<i>FTO-IT1</i>
<i>miR491</i>		<i>LINC00619</i>	<i>CNOT10</i>	<i>RNA, U6 small nuclear 1137, pseudogene</i>	
<i>miR4265</i>		<i>LINC00400</i>	<i>DNAJC9</i>	<i>RNA, U6 small nuclear 1210, pseudogene</i>	
<i>miR4473</i>		<i>LINC00642</i>	<i>MEOX2</i>	<i>RNA, U6 small nuclear 175, pseudogene</i>	
<i>miR670</i>			<i>MLIP</i>	<i>U2 small nuclear 22, pseudogene</i>	
			<i>NLGN1</i>	<i>U6atac pseudogene</i>	
			<i>PABPC1L2B</i>	<i>U6 small nuclear 661, pseudogene</i>	
			<i>SAP30L</i>	<i>U6 small nuclear 352 pseudogene</i>	
			<i>USP12</i>	<i>7SK small nuclear pseudogene 253</i>	
			<i>ZNF790</i>	<i>7SK small nuclear pseudogene 124</i>	
				<i>U7 small nuclear 65 pseudogene</i>	
				<i>7SK small nuclear pseudogene 283</i>	
				<i>U6 small nuclear 1048 pseudogene</i>	
				<i>U6 small nuclear 1233 pseudogene</i>	
				<i>GOLGA8S</i>	
				<i>U2 small nuclear 6 pseudogene</i>	
miR3926-1		LINC00652	PTPRD	Ro-associated Y1 pseudogene	
miR4273			FGF14	7SK small nuclear pseudogene 259	
			FUT8		
			FOXN3		

In grey and italics: down-regulated genes in PVZ GSCs; in black and bold letters: up-regulated genes in PVZ GSCs

Supplementary table 3 : Patient baseline characteristics

	Patients with <i>RND1</i> underexpression (n=26)	Patients with <i>RND1</i> overexpression (n=158)	P value
<i>Age (years)</i>			
<i>Age <60</i>	13 (50.0%)	93 (58.9%)	p = 0.3969
<i>Age >60</i>	13 (50.0%)	65 (41.1%)	
<i>G-CIMP status</i>			
<i>G-CIMP</i>	1 (3.8%)	16 (10.5%)	p = 0.4737
<i>Non G-CIMP</i>	25 (96.2%)	137 (89.5%)	
<i>Missing</i>	0	5	
<i>Karnofsky index</i>			
<70	4 (15.4%)	27 (17.1%)	p = 1.0000
>70	22 (84.6%)	131 (82.9%)	
<i>Initial pathologic diagnosis</i>			
<i>Excisional biopsy</i>	1 (3.8%)	29 (18.7%)	p = 0.0839
<i>Tumor resection</i>	25 (96.2%)	126 (81.3%)	
<i>Missing</i>	0	3	
<i>Molecular subtype</i>			
<i>Classical</i>	6 (23.1%)	46 (29.1%)	p = 0.0002
<i>Mesenchymal</i>	17 (65.4%)	37 (23.4%)	
<i>Neural</i>	1 (3.8%)	30 (19.0%)	
<i>Proneural</i>	2 (7.7%)	45 (28.5%)	

Supplementary table 4 : List of signaling pathways from KEGG

Pathway	pvalueZE	Number of common genes	Common genes
ECM RECEPTOR INTERACTION	1.32e-09	18/84	COL6A2 COL6A3 COL5A2 COL6A1 ITGA4 ITGA5 COL5A1 COL3A1 ITGB1 LAMC1 COL1A1 LAMA5 LAMB1 COL1A2 CD44 THBS3 SDC1 THBS1
FOCAL ADHESION	1.05e-07	25/201	LAMC1 LAMA5 LAMB1 FLNA MET THBS3 THBS1 ACTN1 CAV2 CAV1 COL6A2 COL6A3 COL5A2 COL6A1 ITGA4 ITGA5 COL5A1 COL3A1 ITGB1 COL1A1 COL1A2 VCL SHC1 RAC2 PPP1CA
LYSOSOME	1.72e-04	14/121	IGF2R CTSC CD164 CTSB TCIRG1 GNS DNASE2 M6PR GUSB GLA NPC2 GLB1 HEXB CTSA
PROTEIN EXPORT	1.77e-03	5/24	SRPR HSPA5 OXA1L SEC11A SEC61A1
O GLYCAN BIOSYNTHESIS	4.93e-03	5/30	GALNT4 GALNT7 GCNT1 GALNT2 ST3GAL1
APOPTOSIS	1.69e-03	10/88	CASP8 CASP7 MYD88 TNFRSF1A NFKB1 IL1RAP IL1R1 IRAK1 TRADD FAS
N GLYCAN BIOSYNTHESIS	2.91e-02	5/46	RPN2 MGAT2 GANAB DDOST MAN2A1
COMPLEMENT AND COAGULATION CASCADES	1.51e-02	7/69	PLAUR PLAU TFPI CD59 CD46 PROS1 SERPINE1
GLYCOSPHINGOLIPID BIOSYNTHESIS GANGLIO SERIES	1.75e-02	3/15	GLB1 ST3GAL1 HEXB
GLYCOSAMINOGLYCAN DEGRADATION	7.26e-03	4/21	GLB1 GUSB GNS HEXB
GLYCOSPHINGOLIPID BIOSYNTHESIS GLOBO SERIES	1.44e-02	3/14	GLA ST3GAL1 HEXB
REGULATION OF ACTIN CYTOSKELETON	7.56e-03	16/216	ARPC5 ARPC1B PFN1 MYH9 ACTN1 IQGAP1 ITGA4 ITGA5 SLC9A1 ITGB1 VCL RAC2 PPP1CA ARPC2 RRAS GNG12
ADHERENS JUNCTION	7.14e-03	8/75	SNAI2 ACTN1 RAC2 IQGAP1 VCL TGFB2 MET PTPN1

Supplementary table 5 : Details about genes that form the 6 gene prognostic signature

Gene symbol	Gene name	Protein description	Lasso coefficient	BSS
ITGA5	Integrin alpha 5	In association with integrin beta 1, they form a cell adhesion protein	0.18785091	0.793
COL5A1	Collagen Type V Alpha 1 Chain	Extracellular matrix protein	0.07963124	0.552
COL3A1	Collagen Type III Alpha 1 Chain	Extracellular matrix protein	-0.09632951	0.617
LAMC1	Laminin subunit gamma 1	Extracellular matrix protein	0.17416926	0.528
COL1A2	Collagen Type I Alpha 2 Chain	Extracellular matrix protein	-0.04758932	0.527
MET	MET	HGF Receptor	0.07033914	0.602

Supplementary table 6: Extracellular matrix proteins

Protein	Concentration	Reference	Suppliers
Laminin 111	1.5 µg/cm ²	L2020	Sigma
Fibronectin	1.5 µg/cm ²	354008	BD Biosciences
Vitronectin	1.5 µg/cm ²		Prepared as described in Yatohgo et al., Cell Struct Funct, 1988.

Supplementary table 7: Primary antibodies

Marker	Antibodies	Reference	Suppliers	Application
A2B5	IgM mouse monoclonal antibody– APC	130-093-582	Miltenyi	Flow cytometry
α3 integrin	IgG1 mouse monoclonal antibody	MAB1952	Millipore	Function-blocking antibody
α6 integrin	IgG2a,K rat monoclonal antibody	MAB1378	Millipore	Function-blocking antibody
α6 integrin	IgG2a _κ -PE rat monoclonal antibody-PE	12-0495	eBiosciences	Flow cytometry
β1 integrin	IgG1 mouse monoclonal antibody	MAB2253	Millipore	Function-blocking antibody/Flow cytometry
β4 integrin	IgG1 mouse monoclonal antibody	Clone AA3	Gift from Dr Quaranta	Function-blocking antibody
β4 integrin	IgG2b mouse monoclonal antibody-AF488	FAB4060G	R&D Systems	Flow cytometry
CD133	IgG2B mouse monoclonal antibody-PE	130-090-853	Miltenyi	Flow cytometry
GFAP	mouse monoclonal	MAB 5628	Millipore	Immunofluorescence
nestin	mouse monoclonal	MAB5326	Millipore	Immunofluorescence /Immunohistochemistry
sox2	mouse monoclonal	MAB4343	Millipore	Immunofluorescence
β3 tubulin	mouse monoclonal	MAB1637	Millipore	Immunofluorescence

Supplementary table 8: Quantitative PCR primer sequences (Eurogentec)

Gene	Forward primer	Reverse primer
$\alpha 3$ integrin	5' TGTGGCTTGGAGTGACTGTG 3'	5' TCATTGCCTCGCACGTAGC 3'
$\alpha 6$ integrin	5'TGATCGAAATTCCTACCCTGATG 3'	5'TAATCACAGGCCGGGATCTG 3'
$\beta 2$ microglobulin	5' ACCCCCACTGAAAAAGATGA 3'	5' ATCTTCAAACCTCCATGATG 3'
$\beta 1$ integrin	5' CAAAGGAACAGCAGAGAAGC 3'	5' ATTGAGTAAGACAGGTCCATAAGG 3'
$\beta 4$ integrin	5' CTGTACCCGTATTGCGACT 3'	5' AGGCCATAGCAGACCTCGTA 3'
CD133	5' GCATTGGCATCTTCTATGGTT 3'	5' CGCCTTGTCTTGGTAGTGT 3'
GFAP	5' GGCAAAAGCACCAAAGACGG3'	5' GCGGCGTTCATTACAAAT3'
MAL	5' CGCTGCCCTCTTTTACCTCAG 3'	5' GAAGCCGTCTTGCATCGTGAT 3'
Olig1	5'-AGGTAACCAGGCGTCTCACAGT-3'	5' CGGTACTCCTGCGTGTTAATGA 3'
Olig2	5'-CAGAAGCGCTGATGGTCATA-3'	5' TCGGCAGTTTGGGTTATTC 3'
OMG	5' TAGGGACTCCATGTTCTACCCA 3'	5' TCTGCATCCCACTTACAGTGA 3'
Nestin	5' ATCGCTCAGGTCCTGGAAGG 3'	5' AAGCTGAGGGAAGTCTTGAG 3'
Rnd1	5' GCAAGTGTTAGCGAAGGATTG 3'	5' GCAGAGTGGACGGACATTATC 3'
Sox2	5' GCACATGAACGGCTGGAGCAACG 3'	5'TGCTGCGAGTAGGACATGCTGTAGG 3'
$\beta 3$ tubulin	5'GCTCAGGGGCCTTTGGACATCTCTT3'	5' TTTTCACACTCCTCCGCACCACATC3'

Supplementary table 9: Percentages of GSCs in neurospheres

	% of GSCs in neurospheres
CT1	60.9+/-16.5
PVZ1	75.1+/-8.9
CT2	56.5+/-6.8
PVZ2	64.5+/-11.7

Supplementary table 10: references of the selected datasets

Study number	Serie number	References	Fold	p value
A	GSE4381	Yamanaka R et al. Oncogene. 2006. PMID: 16652150	-2,43	1,10E-09
B	GSE19728	Zhongyu L et al. Molecular neurobiology. 2012. PMID: 23135747	-2,43	0,0493
C	GSE61335	Joy A et al. PLoS One. 2014. PMID: 24984002	-2,14	0,000000000049
D	GSE15824	Grzmil M et al. Cancer Res. 2011. PMID: 21406405	-1,84	0,0046
E	GSE4290	Sun L et al. Cancer Cell 2006. PMID: 16616334	-1,86	3,90E-05
F	GSE66354	Donson M A. UC Denver	-1,84	0,0029
G	GSE22866	Etcheverry A et al. BMC Genomics. 2010. PMID: 21156036	-5,96	2,60E-11
H	GSE10878	de Tayrac M et al. Genes Chromosomes Cancer. 2009. PMID: 18828157	-1,72	3,70E-05
I	GSE15209	Pollard SM et al. Cell Stem Cell 2009.	-1,37	0,0044
J	GSE12657	Margareto J et al. J Mol Neurosci. 2007.	-1,76	0,0003
K	TCGA	Cancer Genome Atlas Research Network. Nature. 2008. PMID: 18772890; 20129251; 20399149; 20838435	-1,46	0,0016
L	GSE14805	Hodgson JG et al. Neuro Oncol 2009. PMID: 19139420	-3,83	3,30E-05
M	GSE68848	REMBRANDT	-1,75	0,0005

Rôle de la GTPase Rho RND1 dans la réponse cellulaire à la camptothécine, inhibiteur de la topoisomérase I

Résumé

La famille des GTPases Rho, comprenant 20 membres, contrôle la dynamique du cytosquelette d'actine et différents processus cellulaires comme la migration. En plus de leurs rôles bien établis, certaines GTPases Rho, notamment RhoB et Rac1, ont émergé en tant que gènes de réponse précoce aux dommages à l'ADN. En effet, RhoB est induite en réponse à divers stress génotoxiques, y compris la camptothécine (CPT), les UV et le cisplatine, et protège principalement les cellules de l'apoptose. Le rôle des autres GTPases Rho en réponse précoce aux génotoxiques reste largement méconnu. Dans ce projet, nous avons utilisé la camptothécine, un inhibiteur de la topoisomérase I (TOP1), qui stabilise sélectivement les complexes de clivage TOP1-ADN (TOP1cc) sur la chromatine, afin de cribler les GTPases Rho induites de façon précoce par les dommages à l'ADN. En plus de RhoB, nous avons identifié RND1 comme un gène rapidement induit par la CPT. L'induction de RND1 est réversible et étroitement corrélée à la présence de TOP1cc induit par la CPT. En accord avec ces observations, les rayons UV et le peroxyde d'hydrogène, qui stabilisent indirectement les TOP1cc, induisent également RND1. La CPT augmente la transcription de RND1 indépendamment de l'activité de son promoteur minimal. De plus, la CPT augmente l'activité de la poly ADP-ribose polymérase (PARP1), dont l'inhibition prévient la transcription de RND1. La surexpression de RND1 augmente également l'expression de PARP1, suggérant une régulation positive entre PARP1 et RND1 en réponse aux TOP1cc. Ainsi, nous proposons qu'en réponse à la CPT, les TOP1cc activent PARP1, qui à son tour favorise la transcription de RND1, initiant ainsi une boucle de rétrocontrôle positive. Enfin, nous avons montré que RND1 protège les cellules contre l'apoptose induite par la CPT et entraîne leur résistance à la CPT. L'ensemble de ces résultats ont permis d'identifier RND1 comme nouvelle GTPase Rho impliquée dans la réponse au stress et proposent un nouveau mécanisme de régulation de la transcription des gènes en réponse aux TOP1cc via l'activation de PARP1. Ces résultats suggèrent par ailleurs qu'inhiber la signalisation de RND1 pourrait sensibiliser les cellules tumorales aux dérivés cliniques de la CPT.

Mots clés : RND1, Camptothécine, Topoisomérase I, PARP1, Transcription, Apoptose

Role of the Rho GTPase RND1 in the cellular response to the topoisomerase I inhibitor camptothecin

Summary

Rho GTPase family comprises 20 members that regulate key cellular functions such as actin cytoskeleton organization and migration. Beside their canonical functions, certain Rho GTPases, including RhoB and Rac1, emerged as early DNA damage-inducible genes. Indeed, RhoB is readily induced in response to various genotoxic stress, including camptothecin (CPT), UV and cisplatin, and primarily protect cells against apoptotic cell death. Whether other Rho GTPases also respond early to genotoxics is largely unknown. In this project, we used camptothecin, a topoisomerase I (TOP1) inhibitor that selectively stabilized TOP1-DNA cleavage complexes (TOP1cc) onto chromatin, to screen for early DNA damage-inducible Rho GTPases. Besides RhoB, we identified RND1 as a gene rapidly induced by CPT. RND1 induction is reversible and closely associated with the presence of TOP1cc induced by CPT. Consistently, UV light and hydrogen peroxide, which indirectly stabilized TOP1cc, induce RND1 as well. CPT increases minimal promoter-independent RND1 transcription. Additionally, CPT increases poly ADP-ribose polymerase (PARP1) activity, whose inhibition prevents RND1 transcription. Overexpression of RND1 also increases PARP1 expression, suggesting a positive regulation between PARP1 and RND1 in response to TOP1cc. Thus, we propose that in response to CPT, TOP1cc activate PARP1, which in turn promotes RND1 transcription resulting in a positive feedback loop. Finally, we found that RND1 protects cells against CPT-induced apoptosis and leads to resistance to CPT. Together, these results highlight RND1 as a new Rho GTPase involved in the response to stress and propose a new mechanism for TOP1cc-induced gene transcription through PARP1 activation. These findings further suggest that inhibiting RND1 signaling could sensitize tumor cells to CPT derivatives.

Keywords : RND1, Camptothecin, Topoisomerase I, PARP1, Transcription, Apoptosis.