



**HAL**  
open science

# Les inhibiteurs de PARP dans le traitement des cancers chimio-résistants : étude pré-clinique sur la dépendance à PARP

Judith Michels

► **To cite this version:**

Judith Michels. Les inhibiteurs de PARP dans le traitement des cancers chimio-résistants : étude pré-clinique sur la dépendance à PARP. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T049 . tel-01063796

**HAL Id: tel-01063796**

**<https://theses.hal.science/tel-01063796>**

Submitted on 18 Sep 2014

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

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

UNIVERSITE PARIS XI  
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Champ disciplinaire : Oncologie

Ecole doctorale de rattachement : Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

**Judith MICHELS**

Le 12 septembre 2013

**Les Inhibiteurs de PARP dans le Traitement des Cancers  
Chimio-Résistants.  
Etude pré-clinique sur la Dépendance à PARP.**

Directeur de Thèse  
Président de jury

Pr Guido Kroemer  
Pr Eric Deutsch

Rapporteur  
Rapporteur

Dr Carmen Garrido  
Dr Didier Decaudin

Examineur  
Examineur

Catherine Brenner  
Maria Castedo

INSERM U848 'Apoptosis, Cancer & Immunity'  
Pavillon de recherche, Gustave Roussy  
39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France



Cette thèse a été réalisée en partie grâce aux financements des organismes suivants :

*Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche*



*Action Lions 'Vaincre le Cancer'*



## Remerciements

A **Guido Kroemer** mon directeur de thèse au génie duquel j'ai pu quelque peu m'approcher.

A **Eric Deutsch** qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

A mes rapporteurs **Carmen Garrido** et **Didier Decaudin** pour avoir été disponibles et réactifs afin de me donner des conseils précieux pour finaliser mon manuscrit.

A **Catherine Brenner** pour accepter d'examiner ma soutenance.

A **Maria Castedo** qui a su me donner le goût de la recherche avec beaucoup de rigueur et de sérénité, ma déesse.

A **Jean-Charles Soria** qui a su m'orienter vers un laboratoire d'excellence et nous donner un accès essentiel à du matériel précieux.

A **Lorenzo Galluzzi** qui m'a fait découvrir une capacité de travail insoupçonnée et des saveurs italiennes raffinées.

A **Ilio Vitale** qui a su m'assister dans mes débuts avec beaucoup de gentillesse et de dévouement.

A **Patricia Pautier** et **Sébastien Gouy**, ainsi que **Karim Fizazi** pour avoir accepté de collaborer dans nos projets passionnants.

A ma mère qui a toujours su patiemment trouver les mots réconfortants.

A mon père qui a su me guider dans mes ambitions.

A ma douce sœur bienveillante.

A mon Georges bienaimé qui a su accepter ma passion pour le travail.

A BeauBeau qui a su me donner tellement d'amour et d'assurance.

A Marie et Claire pour l'ambiance inoubliable de notre bureau.

A Delphine qui a su me faire décompresser avec beaucoup d'amitié et de tendresse.

A Estelle pour sa spontanéité, son humour débordant et sa sensibilité touchante.

A Mathilde pour sa franchise, son intelligence et ses bons conseils.

A mes copains radiothérapeutes qui étaient patients avec mes virées côté recherche.

A mes amis tellement précieux.

## RESUME

**Introduction** Le cancer bronchique est un problème de santé publique en étant la première cause de décès par cancer dans le monde. Il reste de mauvais pronostic avec une résistance au Cisplatine qui est inéluctable dans l'histoire naturelle de la maladie. Nous nous sommes intéressés à l'association du CDDP aux inhibiteurs de la Poly(ADP-ribose) polymérase. Les inhibiteurs pharmacologiques de PARP sont source d'optimisme en oncologie clinique en monothérapie pour des tumeurs déficientes pour une voie de réparation de l'ADN et en association aux cytotoxiques classiques.

**Matériel et méthodes** Nous avons généré 9 clones résistants au CDDP après culture de la lignée A549 dans des faibles doses de CDDP. Deux inhibiteurs pharmacologiques de PARP, CEP8983 (CEP) et PJ34 (PJ), ainsi que des siRNA spécifiques de PARP1 sont utilisés pour l'inhibition de PARP. L'apoptose est mesurée en cytométrie de flux par l'intermédiaire du potentiel membranaire de la mitochondrie DiOC<sub>6</sub>(3) et la perméabilisation de la membrane plasmique est évaluée par l'iodure de propidium. Le test de clonogénicité permet d'évaluer la capacité des cellules à échapper à la mort et à former une colonie. L'activité métabolique des cellules est mesurée par la mesure de clivage du sel de tetrazolium WST-1. L'immunofluorescence sur cellules fixées a permis d'étudier les dommages de l'ADN ( $\gamma$ H2AX), la voie intrinsèque de l'apoptose (l'activation de la caspase 3 et la libération du cytochrome c) et la recombinaison homologue (BRCA1, RAD51). En Western Blot nous avons mesuré l'expression et l'activité de PARP (PAR) ainsi que l'expression d'acteurs de la réparation par excision de base (BER) (XRCC1 and polymérase  $\beta$ ). Nous avons développé une méthode de détection de PAR en immunohistochimie sur des tissus inclus en paraffine.

**Résultats** Nous avons trouvé un effet synergique pour l'association du CDDP aux inhibiteurs de PARP *in vitro*. De façon inattendue nous avons observé que les clones résistants au CDDP développent une addiction à PARP et sont spécifiquement tués par l'inhibition de PARP contrairement à la lignée parentale. Ces clones exhibent une hyperexpression et une hyperactivité de PARP. La réponse aux inhibiteurs de PARP corrèle plus précisément avec l'activation plutôt qu'avec l'expression de PARP, pointant que PAR est un biomarqueur plus précis que PARP. Nous avons observé que l'hyperactivation de PARP accompagne une résistance induite au CDDP et prédispose à une sensibilité aux inhibiteurs de PARP dans d'autres lignées de cancer bronchique (H460 et H1650), de mésothéliome (P31), de cancer de l'ovaire (TOV112D) et de col (HeLa). Dans des expériences *in vivo* nous avons noté que dans les xénogreffes obtenues à partir de clones résistants au CDDP, l'expression de PAR est stablement retrouvée en immunohistochimie. Ces tumeurs répondaient à l'inhibition de PARP par le PJ en diminuant l'expression de PAR. Les clones résistants au CDDP sensibilisés aux I PARP ont une recombinaison homologue conservée, cependant ont un déficit dans les étapes terminales du BER.

**Conclusion** Nous avons identifié un effet synergique pour l'association des inhibiteurs de PARP au CDDP de des lignées de cancer bronchique. Nous avons observé une dépendance à PARP dans des lignées de cancer bronchique résistantes au CDDP et déficientes pour l'élongation du BER. Nous postulons que PAR est un biomarqueur spécifique de la réponse aux inhibiteurs de PARP.

## ABSTRACT

**Introduction** Driven by the facts that non small cell lung cancer (NSCLC) is the leading cause of cancer-related morbidity and mortality worldwide and that NSCLC patients often develop resistance against Cisplatin (CDDP)-based therapies, we addressed the question of the combination therapy of CDDP with poly(ADP-ribose) polymerases (PARP) inhibitors. Inhibitors of PARP have raised great expectations for the treatment of a variety of cancers, either as monotherapeutic agent against DNA repair-deficient tumours or combined to DNA-damaging compounds.

**Material and methods** We generated nine CDDP-resistant clones by prolonged exposure to low dose CDDP of the A549 NSCLC parental cell line. Two distinct PARP inhibitors, CEP8983 (CEP) and PJ34 (PJ) as well as PARP1 knockdown with small interfering RNAs (siRNAs) were used for PARP inhibition. Apoptosis was measured by the simultaneous assessment for the loss of the mitochondrial transmembrane potential ( $Dy_m$ ) and the breakdown of the plasma membrane using the  $Dy_m$ -sensitive fluorochrome DiOC<sub>6</sub>(3) and the vital dye propidium iodide, respectively. Moreover clonogenic survival was assessed. *In vitro* assessments of the enzymatic activity of cells were based on the reduction of the colorless tetrazolium salt. Immunofluorescence microscopy determinations were performed with antibodies specific for DNA damage ( $\gamma$ H2AX), intrinsic apoptosis (cleaved Caspase-3 and cytochrome *c*), and homologous recombination (RAD51 and BRCA1). Immunoblotting was assed for PARP1 expression and activity (PAR) and base excision repair (BER) effectors (XRCC1 and polymerase  $\beta$ ). We developed an immunohistochemical staining method that specifically detects PAR on paraffin-embedded cell pellets and tissue sections.

**Results** We found that PARP inhibitors and PARP1 siRNAs synergized with CDDP in the killing of NSCLC cells *in vitro*. Unexpectedly, CDDP-resistant NSCLC cell clones developed addiction to PARP hyperactivation, thereby becoming susceptible to apoptosis induction by PARP inhibition. We showed that these cisplatin-resistant clones, exhibited high PARP protein levels and increased PARP activity, leading to an increased poly-ADP ribosylation of cellular proteins, as compared to their parental, cisplatin-sensitive counterparts. These cisplatin-resistant cells become susceptible to cell death as induced by PARP inhibition, correlating with the hyperactivity of PARP (elevated PAR levels) more accurately than with the overexpression of PARP. Suggesting that PAR levels may constitute a more accurate biomarker than PARP to predict the sensitivity of cells to PARP inhibition. We expanded the observation that cisplatin resistance causes PARP upregulation and hyperactivation and subsequent sensitization to PARP inhibition to additional five human cancer cell lines including two NSCLC (H1650 and H460), one mesothelioma (P31), one ovarian (TOV112D) and one cervical cancer (HeLa) cell line. To get further insight into this issue, we generated *in vivo* experiments. Tumors derived from CDDP-resistant cells were characterized by elevated levels of PAR suggesting that PAR levels are preserved during tumor formation. Those PAR-overexpressing tumors responded to the administration of PJ *in vivo* with a consistent reduction in PAR immunoreactivity. CDDP resistant clones that are specifically killed by PARP inhibitors assessed efficient homologous recombination repair however deficient BER elongation.

**Conclusion** We showed a beneficial effect for the association therapy of PARP inhibitors with CDDP in several NSCLC cell lines. We have identified an addiction to PARP in CDDP resistant cell lines with deficient BER elongation. We postulate that PAR is a specific predictive biomarker for the response to PARP inhibitors.

## **Sommaire**

**Abréviations** ..... page 8

**Introduction** ..... page 10

1. La superfamille des Poly(ADP) ribose polyméras. Etat des lieux et rôles attribués.
  - 1.1. Réparation de l'ADN
  - 1.2. La mort cellulaire
  - 1.3. Autres rôles: inflammation, métabolisme cellulaire, stabilité génétique
2. Les inhibiteurs de PARP
  - 2.1. Les applications : association à la chimio- et à la radiothérapie; la monothérapie et la létalité synthétique.
  - 2.2. La Cytotoxicité.
  - 2.3. La résistance aux inhibiteurs de PARP.
  - 2.4. Les données cliniques précoces : les espoirs et les déceptions.
  - 2.5. Les biomarqueurs prédictifs de la réponse aux inhibiteurs de PARP

**Résultats** ..... page 36

1. La résistance au CDDP associée à l'hyperactivation de PARP.
  - 1.1. L'interaction de l'inhibition de PARP et du CDDP dans le cancer bronchique non à petites cellules.
  - 1.2. Mort sélective des lignées humaines cancéreuses résistantes au CDDP induite par les inhibiteurs de PARP.
  - 1.3. L'hyperactivation de PARP exprimée par les polymères de Poly(ADP)ribose (PAR) prédit la réponse aux inhibiteurs de PARP.
  - 1.4. Les mécanismes de mort induite par les inhibiteurs de PARP.
  - 1.5. Les déficits en réparation de l'ADN des lignées sensibles aux inhibiteurs de PARP.
2. Effet synergique des inhibiteurs de PARP et du CDDP. Indépendance par rapport au p53.

**Discussion et Perspectives** ..... page 43

1. L'intérêt d'associer les inhibiteurs de PARP aux autres cytotoxiques.
2. L'hyperPAR(ylation) protéique et la résistance au CDDP.
3. Les inhibiteurs de PARP1 : Ange ou Démon: La prévention ou la génération de cancers.
4. PAR un biomarqueur prédictif de la réponse aux inhibiteurs de PARP.
5. La classification des tumeurs en PAR<sup>low</sup> et PAR<sup>high</sup>.

**Références** ..... page 52



## Abréviations

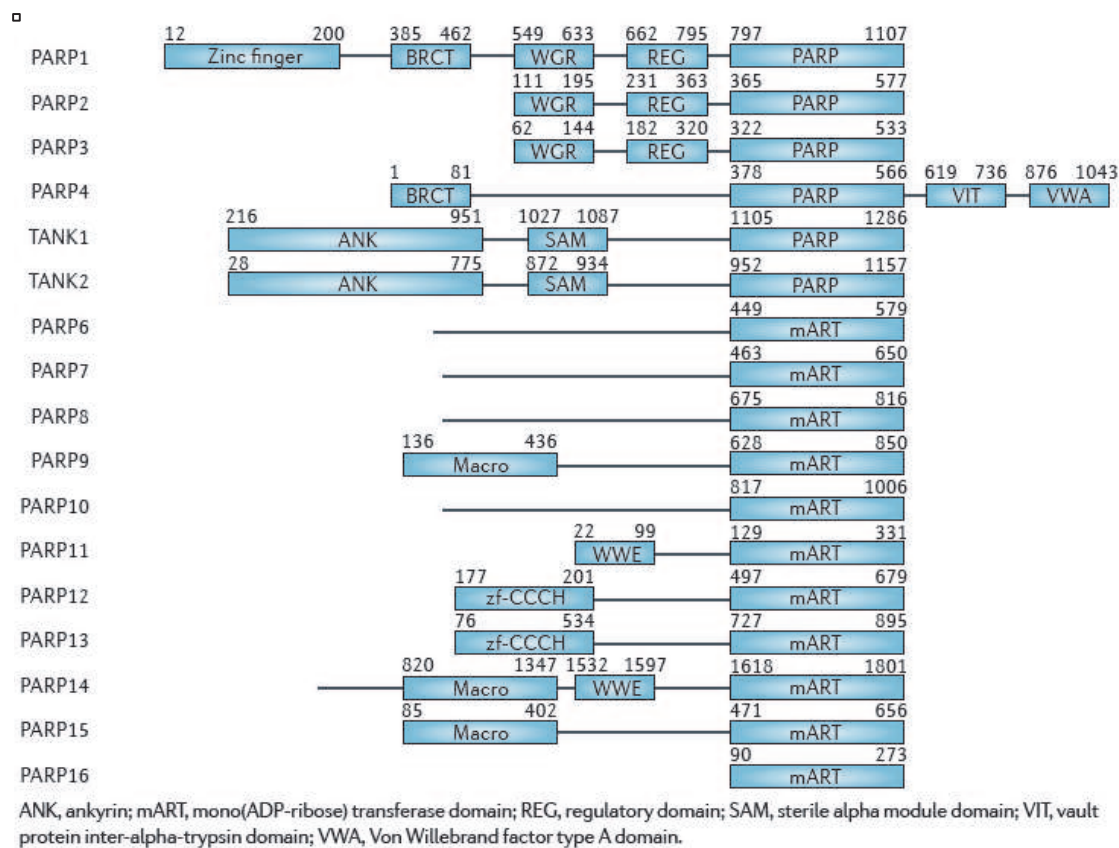
AIF, Apoptosis-inducing factor;  
ATM, ataxia-telangiectasia mutated;  
BER, réparation par excision de base ou base excision repair;  
bid, twice a day;  
53BP1, p53-binding protein-1  
BRCA, breast cancer gene ;  
CBNPC, cancer bronchique non à petites cellules;  
CBR, clinical benefit rate;  
CDDP, Cisplatin;  
CDK1, cyclin-dependent kinase 1;  
CEP, CEP 8983;  
CRM, CDDP response modifier;  
DDB2,damaged DNA-binding protein ;  
DiOC<sub>6</sub>(3), 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide;  
 $\Delta\psi_m$ , mitochondrial transmembrane potential;  
DLT, dose limiting toxicity;  
DNA-PKc, DNA-dependant protein kinase;  
DSB, double strand break;  
e.g., for example;  
EGFR, epidermal growth factor receptor;  
EOC: epithelial ovarian cancer;  
GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;  
GI, gastro intestinal;  
HDAC, histone deacetylase ;  
HER2, human epidermal growth factor receptor 2;  
HMGB1, high mobility group box 1  
HR, hazard ratio;  
HRD score, homologous recombination deficiency score;  
HRR, recombinaison homologue ou homologous recombination repair;  
HSP90, heat-shock protein of 90 KDa;  
ICL, interstrand crosslink;  
i.e., that is;  
LOH, loss of heterozygosity;  
MAPK, mitogen-activated protein kinase;  
MGMT, O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase;  
MMR, mismatch repair;  
MRE11, meiotic recombination protein 11;  
MTD, maximum tolerated dose;  
NAD, nicotinamide adenine dinucleotide;  
NER, réparation par excision de nucléotide ou nucleotide excision repair;  
NF- $\kappa$ B, Nuclear factor-kappa B;  
NHEJ, recombinaison non homologue ou Non homologous end joining;  
NSCLC, non-small cell lung carcinoma;  
ORR, overall response rate;  
OS, overall survival;  
PAR, poly-(ADP-ribose);  
PARG, poly(ADP)glycohydrolase ;  
PARP, poly-(ADP-ribose) polymerase;

PLD, pegylated liposomal doxorubicin;  
PLK3, Polo-like kinase-3;  
PD, progressive disease;  
PFI, platinum free interval;  
PFS, progression-free survival;  
PI, propidium iodide;  
PI3K, Phosphoinositide 3-kinase;  
PJ, PJ34 hydrochloride;  
PS, performance status;  
PSA, prostate-specific antigen;  
PTEN, phosphatase and tensin homolog;  
RECIST, Response Evaluation Criteria in Solid Tumors;  
RNAi, RNA interference;  
siRNA, small-interfering RNA;  
SNP, Single nucleotide polymorphism;  
SSB, single strand break;  
TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$   
TMZ, temozolomide;  
TNBC, triple negative breast cancer;  
XPA, xeroderma pigmentosum complementary group A  
XRCC1, X-ray repair cross-complementing 1.

## Introduction

### 1. La superfamille des Poly(ADP) ribose polymérases. Etat des lieux et rôles attribués.

PARP est une superfamille de protéines regroupant 17 membres (**Figure 1**) qui sont impliqués dans de très nombreuses fonctions cellulaires comme la réparation de l'ADN, la transcription, la régulation de la fourche de réplication, la stabilité génomique, la mort cellulaire mais aussi l'inflammation et la réponse immune ainsi que le métabolisme cellulaire (**Table 1**) (Krishnakumar & Kraus, 2010; Rouleau et al, 2010).



**Figure 1. La superfamille de la Poly(ADP) ribose polymerase PARP.**

La famille PARP contient 17 membres dont 6 ont une fonction de Poly(ADP)ribosylation (i.e. PARP1-4, PARP5A et B aussi connus comme Tankyrase1-2), les autres membres ont une fonction de mono(ADP)ribose. Figure récupérée de (Riffell et al, 2012).

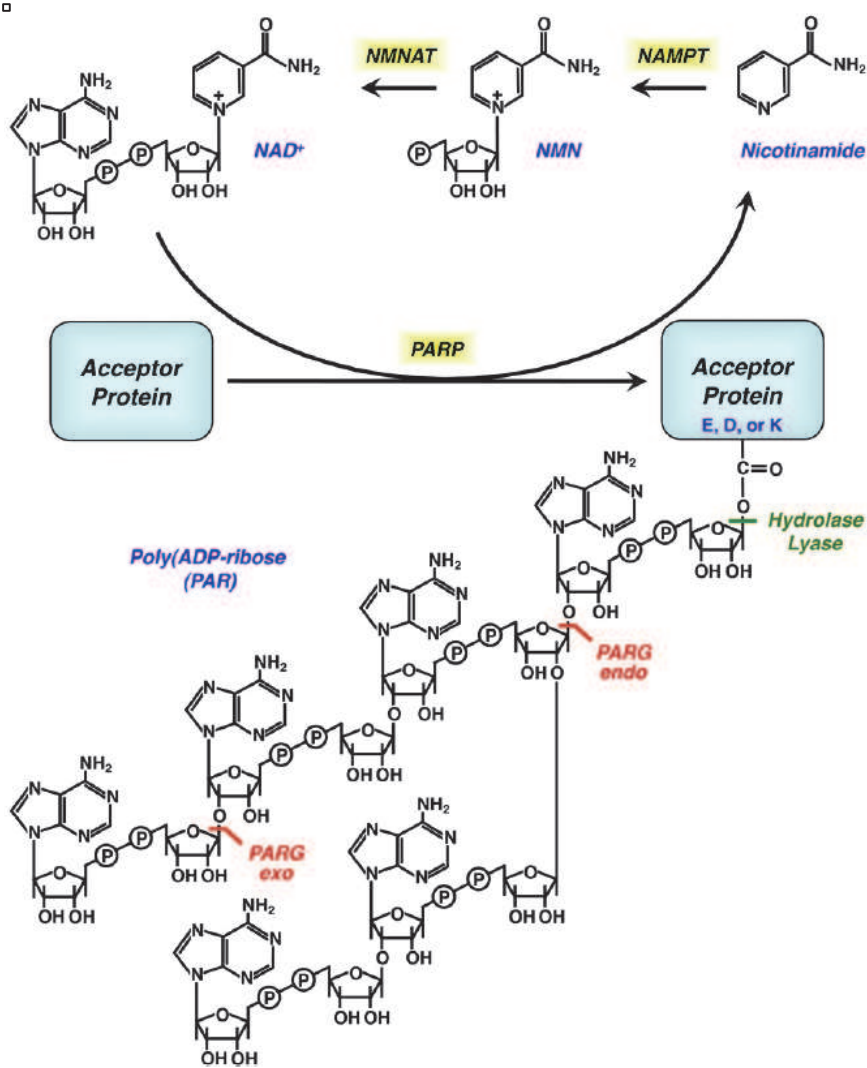
	<b>Actor</b>	<b>Function</b>	<b>Ref.</b>
<b>DNA repair</b>	XRCC1	BER	(Dantzer et al, 1999; Noren Hooten et al, 2011)
	DDB2, XPA	NER	(King et al, 2012; Pines et al, 2012; Robu et al, 2013)
	MRE11	HRR	(Bryant et al, 2009)
	DNA-PK <sub>C</sub>	NHEJ	(Spagnolo et al, 2012)
<b>Genomic stability</b>	Topoisomerase I	Genomic maintenance	(Park & Cheng, 2005)
	Telomere endings	Genomic stability	(Riffell et al, 2012)
	Mitotic spindle poles	Mitosis	(Riffell et al, 2012)
<b>DNA transcription</b>	Histone H1	Decondensation of the double DNA helix	(Kraus & Lis, 2003)
<b>Cell cycle progression</b>	c-Fos, c-Myc	G <sub>0</sub> -G1 transition	(Carbone et al, 2008)
<b>Inflammation</b>	TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, HMGB1	Acute and chronic inflammation	(Rosado et al, 2013)
<b>Cell metabolism</b>	NAD <sup>+</sup>	Mitochondrial respiration	(Bai & Canto, 2012)
<b>Cell death/survival</b>	AIF	Parthanatos	(Wang et al, 2011)
	ROS	Apoptosis	(Aurelius et al, 2012)
	Glycolysis inhibition, NAD <sup>+</sup> depletion	Necrosis	(Aurelius et al, 2012; Bai & Canto, 2012)
	AMPK activation	Autophagy	(Huang & Shen, 2009)

**Table 1. Les multiples fonctions de PARP**

Abréviations : AIF, Apoptosis-inducing factor; AMPK, AMP kinase; ATM, ataxia-telangiectasia mutated; BER, base excision repair; DDB2,damaged DNA-binding protein 2; DNA-PK<sub>C</sub>, DNA-dependant protein kinase; HMGB1, high mobility group box 1; HRR, homologous recombinational repair; NER, nucleotide excision repair; NAD<sup>+</sup>, nicotinamide adenine dinucleotide; NF- $\kappa$ B, Nuclear factor-kappa B;NHEJ, non-homologous end joining; PARP, poly-(ADP-ribose) polymerase; ROS, reactive oxygen species ; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; XPA, xeroderma pigmentosum complementary group A; XRCC1, X-ray repair cross-complementing 1.

PARP est une protéine ubiquitaire dans les différentes espèces (sauf pour la levure où elle n'est pas retrouvée) et est présente dans les différents compartiments cellulaires (i.e. nucléaire, cytoplasmique et mitochondriale) (Hassa et al, 2006). Récemment une nouvelle classification des membres de la famille PARP a été proposée selon leur activité de Poly ou mono(ADP)ribosylation et dans ce cadre ils ont été renommés ADP-ribosyltransferases (ART) (Hottiger et al, 2010). En effet 6 membres (i.e. PARP1-4, PARP5A et B aussi connus comme Tankyrase1-2) sont connus à ce jour pour avoir une activité catalytique de Poly(ADP)ribosylation (PARylation) qui est une modification post-traductionnelle de fixation de polymères de poly(ADP)ribose (PAR) sur les différents acteurs cellulaires concernés (**Figure 2**). Ce phénomène consomme le substrat nicotinamide adenine dinucleotide ( $\text{NAD}^+$ ) et de l'ATP (Jankevicius et al, 2013), impliquant une concurrence entre les membres de la famille PARP et d'autres protéines consommatrices de  $\text{NAD}^+$  comme la sirtuine 1 (Bai & Canto, 2012). PARP1, enzyme de 113kDa, est le membre le mieux caractérisé de la superfamille et détient plus de 75% de l'activité de PARylation de la superfamille PARP. PARP1 comporte (i) un domaine aminoterminal comprenant 2 doigts de Zinc, site de reconnaissance du dommage de l'ADN (ii) un domaine d'automodification par autoPARylation permettant une régulation négative de l'activité de la PARP1 par répulsion électrostatique de l'ADN, (iii) la partie carboxy-terminale renferme le domaine catalytique, site de fixation du  $\text{NAD}^+$  responsable de l'initiation, l'élongation et l'attachement des polymères d'ADP-ribose aux protéines acceptrices (Langelier et al, 2012). La PARylation est un phénomène réversible par dégradation des polymères par notamment deux enzymes : (i) la Poly(ADP) glycohydrolase (PARG) et (ii) l'ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3) (Niere et al, 2012). Etant donné que PARG inhibe l'autorégulation négative de PARP, les inhibiteurs de PARG sont actuellement développés comme une alternative des inhibiteurs de PARP (Tentori et al, 2005). Dans cette thèse nous allons nous concentrer sur la PARP1 qui est

responsable pour la majorité du rôle de PARylation et qui est le membre le mieux connu actuellement.

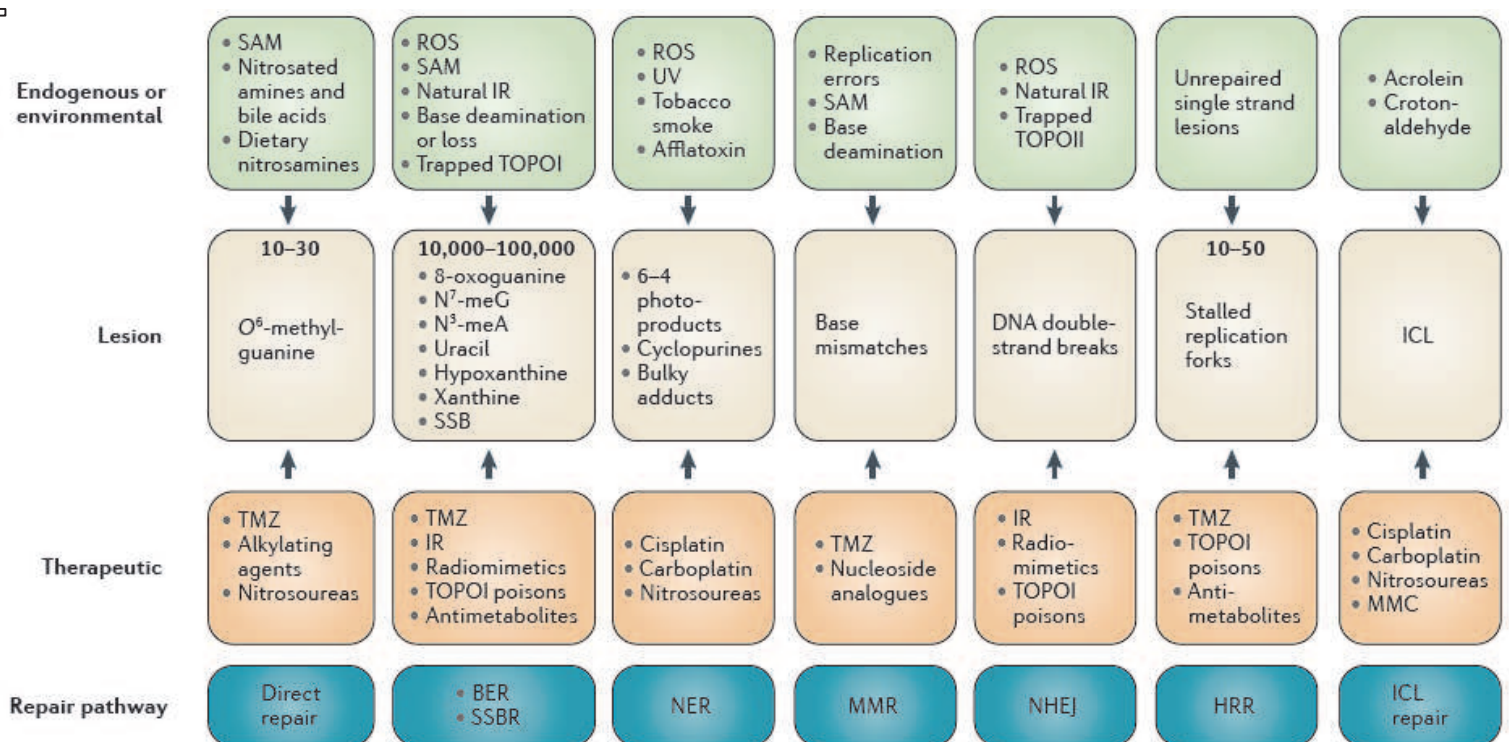


**Figure 2. La biosynthèse de PAR.**

Les structures chimiques de NAD<sup>+</sup>, nicotinamide et PAR. Sont montrés l'activité des enzymes PARP, Poly(ADP) glycohydrolase (PARG), (ADP-ribo-syl) protéine hydrolase et (ADP-ribo-syl) protéine lyase. Figure récupérée de (Krishnakumar & Kraus, 2010).

### 1.1. Réparation de l'ADN

De nombreuses voies de réparation de l'ADN sont activées au quotidien, étant donné l'exposition des organismes à des stress endogènes ou exogènes endommageant l'ADN (Figure 3) (Curtin, 2012).



**Figure 3. Les sources de lésions de l'ADN et les voies de réparation.**

Les sources endogènes et environnementales des endommagements de l'ADN dans les boîtes vertes, les lésions causées dans les boîtes beiges (le nombre quotidien de lésions induites si connu). Les agents thérapeutiques cytotoxiques induisant les lésions correspondantes dans les boîtes oranges. Les voies de réparation de l'ADN dans les boîtes bleues, à l'origine de la stabilité génomique mais également de la résistance aux agents thérapeutiques correspondants. Abréviations : BER, base excision repair; HRR, homologous recombination repair; ICL, interstrand crosslink; IR, ionizing radiation; MMC, mitomycin C; MMR, mismatch repair ; NER, nucleotide excision repair; NHEJ, Non homologous end joining; ROS, reactive oxygen species; SAM, S-adenosyl methionine; SSB, single strand break; SSBR, SSB repair; TMZ, temozolomide; TOPO, topotecan; UV, ultraviolet. Figure récupérée de (Curtin, 2012).

PARP1, qui est activée en réponse à des lésions de l'ADN (Farmer et al, 2005), est impliquée dans la régulation de plusieurs voies de réparation simple et double brin (**Table 1**) (De Vos et al, 2012). En effet, PARP1 est responsable de la PARylation de nombreux acteurs adjacents à la lésion de l'ADN impliquant notamment une décondensation de la double hélice et rendant la lésion accessible au différents protagonistes de la réparation (Luo & Kraus, 2012). L'activité de PARP1 a surtout été impliquée dans le réparation par excision de base ou base excision repair (BER) où elle recrute différentes molécules majeures de cette voie de réparation comme la DNA ligase III, la 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1) et le x-ray cross complementing gene 1 (XRCC1) sur le site de réparation (Dantzer et al, 1999 ; Noren Hooten et al, 2011). Cependant, il a récemment été décrit que le BER pouvait opérer en l'absence de PARP rendant son rôle dispensable (Campalans et al, 2013; Strom et al, 2011).

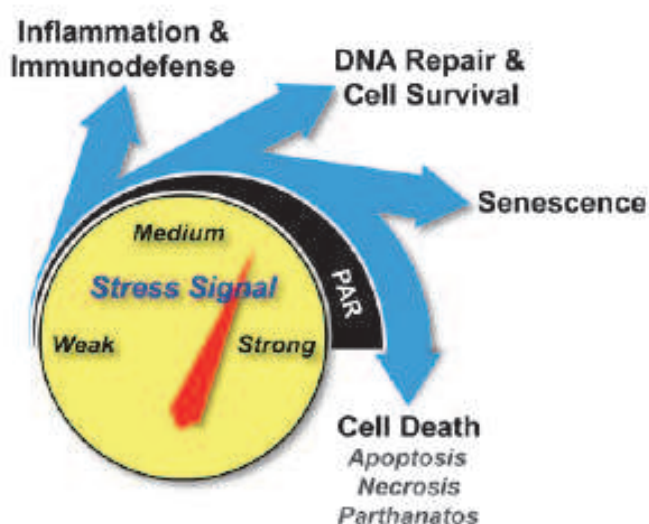
PARP1 a dernièrement été décrit comme interagissant avec deux acteurs essentiels de la réparation par excision de nucléotide ou nucléotide excision repair (NER), notamment le damaged DNA-binding protein 2 (DDB2) (Robu et al, 2013) et le Xeroderma Pigmentosum Complementation Group A (XPA) (King et al, 2012), soulignant son rôle dans d'autres voies de réparation des lésions simple brin.

Finalement, PARP1 interagit au niveau de la fourche de réplication bloquée avec des acteurs de la recombinaison homologue (HRR) comme le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) et le BRCA2 (Yang et al, 2004 ; Ying et al, 2012) ce qui fait de PARP1 un acteur principal de l'initiation de la réparation double brin ainsi que du redémarrage de la fourche de réplication. Selon la coopération de PARP1 avec des protéines impliquées dans la HRR ou la recombinaison non homologue (NHEJ) comme le KU70 et la DNA-dépendant protein kinase (DNA-PK) il favorisera la réparation 'error-free' (i.e. HRR, réparation fidèle à la chromatide sœur) ou 'error-prone' (i.e. NHEJ, réparation aléatoire source d'instabilité génétique) (Couto et al, 2011; Spagnolo et al, 2012).



## 1.2. La régulation de la mort ou survie cellulaire

PARP1 est impliquée dans la réponse au stress cellulaire (e.g. génotoxique, oxydatif, métabolique ou inflammatoire) (Luo & Kraus, 2012). Selon le type et l'intensité du stress auquel la cellule était exposée, seront induit des signaux de survie et notamment de réparation sinon de mort (**Table 1, Figure 4**).



**Figure 4. PARP1, un rhéostat cellulaire.**

Selon l'intensité du stress, PARP1 va médier des réponses cellulaires différentes en fonction de l'intensité de l'activité de PARP1 déclenchée et du volume de polymères PAR formés. Figure récupérée de (Luo & Kraus, 2012).

En effet une hyperactivation de PARP peut induire notamment des signaux de mort cellulaire :

- (i) une nécrose cellulaire par déplétion en  $\text{NAD}^+$  secondaire à la PARylation intensive (Ha & Snyder, 1999) ou
- (ii) la parthanatos par translocation mitochondriale de PAR et relargage secondaire de la protéine Apoptosis-inducing factor (AIF) (Yu et al, 2006). L'activation de PARP peut également induire des signaux de survie cellulaire : (i) une activation de l'autophagie

par activation du complexe LKB1-AMPK secondaire à la déplétion en ATP à l'origine d'une inhibition de mTOR (Huang et al, 2009) ou (ii) la réparation de l'ADN (De Vos et al, 2012).

### **1.3. Autres rôles: inflammation, métabolisme cellulaire et stabilité génétique**

A part son rôle dans la réparation de l'ADN et l'exécution de la mort cellulaire, PARP joue un rôle dans divers processus inflammatoire et dans le syndrome péri-lésionnel ischémique (Ba & Garg, 2011; Strosznajder et al, 2010). PARP1 intervient dans les réactions inflammatoires aiguës et chroniques : (i) en stimulant la sécrétion de médiateurs proinflammatoires (e.g. TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, HMGB1), (ii) en régulant la différenciation des lymphocytes T et (iii) en contrôlant la maturation des lymphocytes B (Rosado et al, 2013). Par ailleurs il existe des données précliniques qui montrent un effet bénéfique de l'inhibition de PARP dans la pathogenèse du diabète et dans la cardio- et neuro-protection dans les maladies vasculaires (Moroni et al, 2012; Pacher & Szabo, 2007; Szabo, 2005). Donc les inhibiteurs de PARP pourraient être utiles dans des maladies autoimmunes ou médiées par une inflammation T chronique.

PARP1 et PARP2 sont impliquées dans la régulation du métabolisme cellulaire selon probablement 3 mécanismes différents : (i) la consommation des réserves de NAD<sup>+</sup>, (ii) la modulation de l'activité des différents acteurs du métabolisme par PARylation directe et/ou (iii) la modulation de la transcription de ces acteurs (Bai & Canto, 2012). La déplétion du NAD<sup>+</sup> implique l'inhibition d'autres protéines NAD<sup>+</sup> dépendantes comme la sirtuine qui induit une diminution de la respiration mitochondriale et du métabolisme oxydatif (Houtkooper et al, 2012).

PARP1 a un rôle essentiel dans la stabilité génétique de part son rôle impliqué dans la réparation de l'ADN. En effet les souris PARP1<sup>-/-</sup> knockout présentent une instabilité génétique accrue mesurée par (1) la fréquence des micronoyaux, l'échange de chromatides sœurs, les aberrations chromosomiques (ii) ainsi qu'une hypersensibilité aux agents alkylants et à la

radiothérapie (Shall & de Murcia, 2000). Le génotype est viable, cependant les souris PARP1<sup>-/-</sup> knockout ont une sénescence accélérée et développent plus fréquemment des tumeurs spontanées ou chimioinduites par rapport aux souris de génotype wild type (Tsutsumi et al, 2001).

## 2. Les inhibiteurs de PARP

Plusieurs inhibiteurs de PARP (I PARP) sont disponibles dans le commerce pour lesquels il existe des données précliniques extensives (**Table 2**) (en bleu, liste non exhaustive). Actuellement 9 inhibiteurs de PARP solubles et spécifiques de PARP1 notamment sont en cours de développement clinique en oncologie et sont tous administrés par voie orale (**Table 2**, en vert) (<http://www.clinicaltrials.gov/>) (Riffell et al, 2012; Rouleau et al, 2010). Nous allons nous intéresser dans cette introduction aux données précliniques *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'aux récentes données cliniques de ces I PARP en monothérapie ou en association aux traitements antitumoraux (chimiothérapie et radiothérapie).

<b>Compagnie</b>	<b>PARP I</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>
Astra Seneca	<b>Olaparib (AZD2281, KU-0059436)</b>	PARP1: 5nM PARP2: 1nM TANK1: 1,5 $\mu$ M
	<b>AZD 2461</b>	
Abbott	<b>Veliparib (ABT888)</b>	PARP1: 5,2nM PARP2: 2,9nM
Cephalon	<b>CEP-8983 (Pro-drogue: CEP-9722)</b>	PARP1: 20nM PARP2: 6nM
Clovis Oncology Inc., Pfizer	<b>Rucaparib, AG014699, AG14447, PF-01367338</b>	PARP1: 1,7nM
BioMarin Pharmaceutical Inc.	<b>BMN-673</b>	PARP1: 0,57nM
Esai Inc.	<b>E7449</b>	
Merck	<b>MK 4827</b>	PARP1: 3,2nM PARP2: 4nM
Eisai/MGI Pharma	<b>GPI-21016, E7016</b>	PARP1: 1,2 $\mu$ M
Guilford Pharmaceuticals	<b>GPI-15427</b>	PARP1: 237nM
commerce	<b>3-aminobenzamide</b>	PARP1: 10 $\mu$ M
	<b>NU1025</b>	PARP1: 0,4 $\mu$ M
	<b>NU1085</b>	PARP1: 0,35 $\mu$ M
	<b>KU-0058948</b>	PARP1: 3,4nM
	<b>PJ34</b>	PARP1: 17nM TANK1: 0,57 $\mu$ M

**Table 2. Les inhibiteurs de PARP1.**

En cours de développement clinique en vert, disponibles dans le commerce en bleu.

## **2.1. Applications dans le traitement du cancer: association à la chimio- et à la radiothérapie; la monothérapie et la létalité synthétique.**

Un effet synergique avec plusieurs chimiothérapies ainsi qu'avec la radiothérapie a été obtenu pour différents I PARP.

Les inhibiteurs E7016 et l'olaparib permettent de potentialiser les lésions d'ADN double brins induites par la radiothérapie dans le glioblastome (Dungey et al, 2008; Russo et al, 2009) ainsi que dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) (Senra et al, 2011).

Les chimiothérapies décrites comme pouvant induire une synergie avec les inhibiteurs de PARP sont les alkylants (e.g. temozolomide (TMZ) et cisplatine (CDDP)) (Huang et al, 2008; Palma et al, 2009), les inhibiteurs de topoisomerase I (e.g. camptothecin, topotecan) (Park & Cheng, 2005) et II (e.g. doxorubicine) (Magan et al, 2012), ainsi que l'antimétabolite gemcitabine (Jacob et al, 2007).

L'effet cytotoxique du TMZ est secondaire à des adduits de groupements méthyles (i.e. O-méthyl, N-méthyl) au niveau de l'ADN. Les groupements N-méthyl sont réparés par le BER qui est compromis par l'inhibition de PARP (Tentori et al, 1999). La synergie est ainsi décrite pour GPI 15427, AG014699 et ABT888 en association au TMZ dans de nombreux modèles précliniques comme le mélanome, le cancer du col utérin, le neuroblastome et la leucémie (Daniel et al, 2009; Horton et al, 2009; Palma et al, 2009; Tentori et al, 2010).

Un effet synergique avec le CDDP a été décrit en préclinique dans le carcinome hépatocellulaire, le cancer du col de l'utérus, les cancers testiculaire et mammaire BRCA1/2 muté (Cavallo et al, 2012; Drew et al, 2011; Gambi et al, 2008; Huang et al, 2008). Les adduits intra ou interbrin de l'ADN induits par le CDDP sont réparés par le NER. Récemment PARP a été reconnu comme ayant un rôle dans la phase initiale (i.e. par interaction avec le damaged DNA-binding protein 2 (DDB2)) (Pines et al, 2013; Robu et al, 2013) et exécutive (i.e. par activation du xeroderma

pigmentosum complementation group A (XPA)) (King et al, 2012) du NER. En effet les lésions induites par le ultraviolets, classiquement réparées par le NER sont amplifiées par l'inhibition de PARP (Vodenicharov et al, 2005).

La synergie avec les inhibiteurs de topoisomérase I (e.g. camptothécine, topotecan) était retrouvé dans le neuroblastome, les cancers colorectaux, mammaires et ovariens (Daniel et al, 2009; Delaney et al, 2000; Thomas et al, 2007) et avec les inhibiteurs de topoisomérase II (e.g. doxorubicine) dans les carcinomes hépatocellulaire et ovarien (Magan et al, 2012; Munoz-Gamez et al, 2011). Les topoisomérase I et II induisent une relaxation et un déroulement de la double hélice de l'ADN, permettant un accès aux enzymes de réplication et de transcription (Wang, 2002). Les inhibiteurs des topoisomérase I et II stabilisent ce déroulement ce qui pérennise les lésions simples et doubles brins induites (Liu et al, 2000) dont la réparation sera compromise par les I PARP (Park & Cheng, 2005).

La létalité synthétique est un phénomène initialement décrit chez la *Drosophile* (Dobzhansky, 1946) impliquant que la mutation d'un seul gène n'est pas létale pour la cellule, mais que l'association de deux mutations induit la mort cellulaire. L'intérêt en cancérologie est de détecter une carence de la cellule tumorale (e.g. une mutation ou une voie de réparation de l'ADN déficiente) la rendant dépendante d'un mécanisme adaptatif et d'inhiber spécifiquement ce dernier. Ceci explique le succès et l'espoir suscité par les I PARP dans les cancers BRCA1/2 mutés (Farmer et al, 2005; Fong et al, 2009). En effet PARP est hyperactivée dans les cancers déficients en HRR (Gottipati et al, 2010).

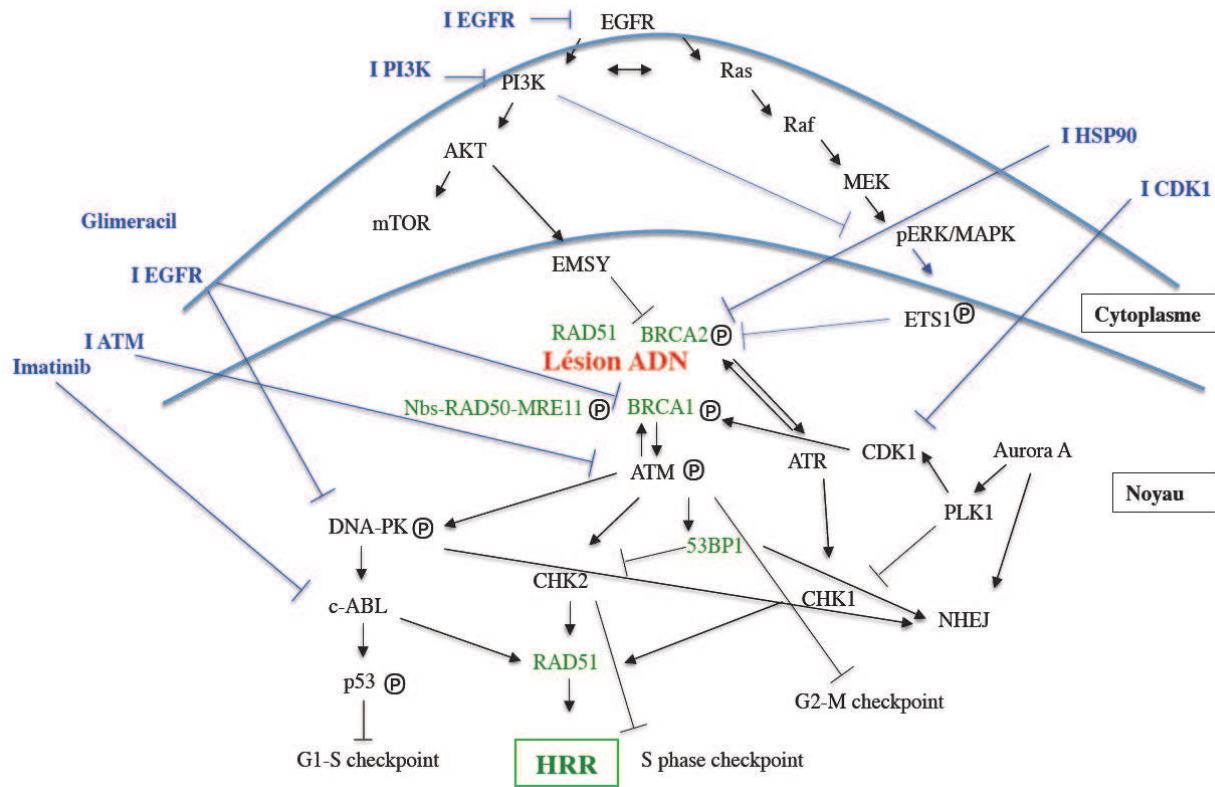
Les cellules tumorales peuvent être déficientes en HRR par des mécanismes alternes à la mutation de BRCA1 ou 2, phénomène communément appelé 'BRCAness'. Plusieurs mécanismes pouvant être impliqués (e.g. l'hyperméthylation du promoteur du gène BRCA, l'amplification de EMSY, la perte de RAD51, la mutation de ATM/ATR ou du gène Fanconi) et sont retrouvés dans 50% des cancers épithéliaux de l'ovaire de type séreux de haut grade qui

sont la forme la plus fréquente et la plus agressive du cancer de l'ovaire (2011). Trois autres mécanismes rentrent dans le cadre du 'BRCAness', (i) la surexpression de la protéine kinase Aurora A impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et la mitose (Cazales et al, 2005; Seki et al, 2008), surexprimée dans certains cancers (Yang et al, 2010), et empêchant le recrutement de RAD51 (Sourisseau et al, 2010), (ii) le déficit en MRE11 protéine du complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) ayant un rôle central au niveau de la fourche de réplication et de la HRR (Bryant et al, 2009; Fraser et al, 2011; Haince et al, 2008) et (iii) l'expression de gènes de fusion ETS (Brenner et al, 2011) retrouvés dans de nombreuses tumeurs (Brenner & Chinnaiyan, 2009) et réprimant le promoteur de BRCA (Baker et al, 2003; Sharrocks, 2001). A noter que les cellules déficientes en MRE11 exhibent une hyperactivité de PARP (Fraser et al, 2012).

Finalement, en l'absence de voie de réparation déficiente la solution est de manipuler pharmacologiquement la HRR afin d'augmenter le champs d'application et d'efficacité des I PARP. En particulier l'inhibition de la HRR peut être secondaire à un traitement par des inhibiteurs de l'ataxia-telangiectasia mutated (ATM) (Schaffner et al, 2000; Weston et al, 2010; Williamson et al, 2010), de la cyclin-dépendent kinase 1 (CDK1) (Johnson et al, 2011), de l'épidermal growth factor receptor (EGFR) (Li et al, 2008; Nowsheen et al, 2011), de la heat shock protein of 90 KDa (HSP90) (Duney et al, 2009; Noguchi et al, 2006), de l'histone deacetylase (HDAC) (Maeta et al, 2005; Zhang et al, 2012), de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Ibrahim et al, 2012; Juvekar et al, 2012), le gimeracil (i.e. composant associé au 5FU dans la molécule S1 afin d'inhiber la dégradation de ce dernier) (Sakata et al, 2011) et l'imatinib (un inhibiteur du transcrit de fusion Bcr-Abl) (Choudhury et al, 2009). A noter que les inhibiteurs de PI3K induisent une hyperactivation de PARP (Ibrahim et al, 2012; Juvekar et al, 2012). Etant donné le nombre et la complexité de ces mécanismes, nous avons essayé de les résumer dans une figure approximative (**Figure 5**).



□



**Figure 5. La manipulation de la recombinaison homologue.**

Les différents acteurs de la recombinaison homologue (HRR) (en vert) pouvant être inhibés par des inhibiteurs pharmacologiques (en bleu) (i.e. I PI3K, I EGFR, I ATM, Imatinib, Glimeracil, I CDK1, I HSP90) afin d'induire une déficience de la HRR en vue d'une sensibilisation à l'inhibition de PARP1. Tableau approximatif.

Abréviations, ATM, ataxia-telangiectasia mutated; CDK1, cyclin-dependent kinase 1; EGFR, epidermal growth factor receptor; HSP90, heat-shock protein of 90 KDa; PI3K, Phosphoinositide 3-kinase;

## 2.2. La Cytotoxicité.

La cytotoxicité induite par les I PARP dans les cellules cancéreuses est probablement liée au rôle de PARP dans la réparation de l'ADN. En effet il a été décrit que l'action des I PARP est de prendre au piège la protéine PARP au niveau du site de lésion de l'ADN empêchant ainsi la progression et le redémarrage de la fourche de réplication (Helleday, 2011). Par ailleurs, l'hypersensibilité aux I PARP des cellules tumorales BRCA mutées déficientes en HRR, serait liée à une hyperactivation de la voie de réparation NHEJ induisant une instabilité génétique (Patel et al, 2011). En effet, cette cytotoxicité est inhibée par des inhibiteurs spécifiques de la

NHEJ (Patel et al, 2011). De plus les I PARP activent la HRR impliquant une cytotoxicité lorsque cette voie est déficiente (Schultz et al, 2003).

Finalement les I PARP peuvent cibler d'autres rôles de PARP que celui de la réparation de l'ADN. En effet, ils induisent (i) un arrêt du cycle en phase G2/M (Farmer et al, 2005), (ii) une inhibition de l'autophagie (Huang & Shen, 2009) en bloquant l'activation du complexe LKB1-AMPK par PARP (Shackelford & Shaw, 2009) et (iii) une activation de la voie intrinsèque de l'apoptose que nous allons détailler dans la section des résultats (Michels et al, 2013a).

### **2.3. La résistance aux inhibiteurs de PARP.**

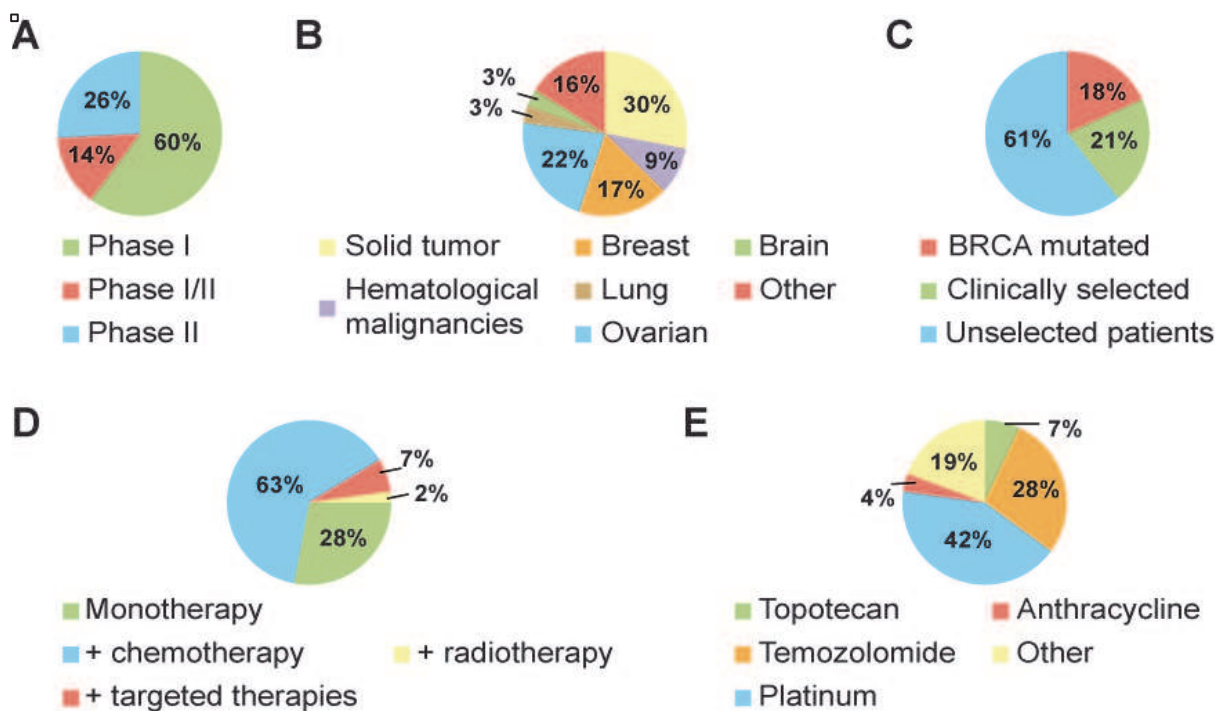
Les tumeurs notamment BRCA mutées peuvent développer une résistance secondaire aux I PARP selon plusieurs mécanismes. Elles peuvent notamment récupérer une fonction de HRR par délétion intragénique et devenir résistantes aux I PARP et au CDDP (Edwards et al, 2008; Sakai et al, 2008).

Un autre mécanisme est la perte de 53BP1 dans les tumeurs BRCA1 mutées (Bouwman et al, 2010; Bunting et al, 2010). 53BP1 est une protéine intranucléaire de réponse à l'endommagement de l'ADN, impliquée dans la réparation double brin. En effet, l'équilibre entre BRCA1 et 53BP1 en réponse à la lésion double brin de l'ADN oriente plutôt vers la HRR que la NHEJ (Aly & Ganesan, 2011). Le déficit du 53BP1 induira un déséquilibre vers la HRR, alors qu'un déficit de BRCA1 vers la NHEJ. En cas de double délétion BRCA1<sup>-/-</sup> et 53BP1<sup>-/-</sup> une réorientation vers la HRR est possible rendant les cellules résistantes aux I PARP. Ce dernier phénomène est dépendant d'ATM (Bryant & Helleday, 2006). En effet l'inhibition d'ATM empêche l'activation du HRR après inhibition de PARP (Bryant & Helleday, 2006).

Pour une revue détaillée des différents mécanismes de résistance aux I PARP en dehors d'un contexte de HRR déficience, se référer à la revue suivante (Montoni et al, 2013).

#### **2.4. Les données cliniques précoces : les espoirs et les déceptions.**

Plusieurs inhibiteurs sont en cours de développement clinique en oncologie, et pour certains des données de phases précoces I et II sont disponibles (**Figure 6, Tables 2 et 3**). A noter que le seul agent ayant atteint au jour d'aujourd'hui la phase III (i.e. l'iniparib, connu également sous BSI-201 ou SAR240550 de BiPar/Sanofi-Aventis) s'est avéré ne pas être un inhibiteur de PARP. En effet, il a des similitudes avec le nicotinamide et inhiberait du coup les enzymes nicotinamide dépendantes comme la sirtuine 1, plutôt que d'avoir une activité directe sur PARP (Patel et al, 2012). Comparé à l'olaparib et au veliparib, l'iniparib n'inhibe pas la PARylation, ne tue pas les cellules HRR déficientes et ne synergise pas avec les inhibiteurs de topoisomérase I (e.g. camptothecin, topotecan). Nous ne discuterons donc pas dans cette section les données cliniques décevantes de cette molécule qui a jeté beaucoup d'ombre sur le développement des inhibiteurs de PARP dans la communauté médicale notamment.



**Figure 6. Les essais cliniques en cours des inhibiteurs de PARP1.** La figure illustre un total de 93 essais cliniques listés dans le registre national du NIH (<http://www.clinicaltrials.gov>). **A.** La distribution selon le stade de l'essai. Il existe une majorité de phases I dont le but est d'étudier la dose maximale tolérée. **B.** Les essais selon les types tumoraux : tumeurs solides (30%), les cancers de l'ovaire (22%), du sein (17%), les maladies hématologiques (9%), les cancers du poumon (3%), les tumeurs cérébrales (3%) ou autres (16%). **C.** Dans la majorité des cas les patients inclus dans les essais ne sont pas sélectionnés (61%) pour des critères de réponses aux inhibiteurs de PARP, comme la mutation de BRCA (18%) ou des critères cliniques de 'BRCAness' (21%) (e.g. cancer épithéliaux de l'ovaire de type séreux de haut grade, cancer du sein triple négatif). **D.** Les stratégies thérapeutiques des essais cliniques des I PARP, en traitement monothérapeutique (28%) ou en association à la chimiothérapie (63%), à d'autres thérapie ciblées (7%) ou à la radiothérapie (2%). **E.** Les essais évaluant le traitement combinatoire avec la chimiothérapie inclus les sels de platine (42%), le temozolomide (28%), le topotecan (7%), les anthracyclines (4%) et d'autres (19%).

Phase	Patient population	Trial design	Results	Grade 3/4 toxicity	Ref.
I	<i>BRCA1</i> or <i>BRCA2</i> mutated ovarian cancer	Phase I (60 pts) with olaparib Expansion phase, 200mg bid in <i>BRCA</i> mutated advanced ovarian cancer (50 pts)	MTD 400mg bid Radiologic RR 28% CBR according to PFI in refractory, resistant and sensitive <i>BRCA</i> mutated EOC: 23, 45 and 69%, respectively	Lymphopenia 8% Anemia 8% GI symptoms 10% Fatigue 4%	(Fong et al, 2009; Fong et al, 2010)
II	<i>BRCA</i> mutated advanced recurrent breast cancer	Olaparib 100 (27 pts) or 400 mg (27 pts) bid	ORR, 21 vs. 41%	Fatigue 15% Nausea 15% Vomiting 11% Anemia 11%	(Tutt et al, 2010)
II	<i>BRCA</i> mutated advanced ovarian cancer	Olaparib 100 (24 pts) or 400 (33 pts) mg bid	ORR, 13 vs. 33% CBR, 21 vs. 52% PFS median, 1.9 (95% CI 1.8-3.6) vs. 5.8 (95% CI, 2.8-10.6)	Fatigue 3% Nausea 6% Anemia 3%	(Audeh et al, 2010)
II	Advanced recurrent high grade ovarian or triple-negative breast cancer (TNBC). Stratification according to <i>BRCA1/2</i> mutation	Olaparib 400mg bid <i>BRCA</i> mutations in 17/64 EOC pts and 10/26 TNBC pts	OR 41% <i>BRCA</i> ovarian cancer OR 24% non mutated ovarian cancer No OR in breast cancer PFS in EOC with <i>BRCA</i> mutation (221d) or without (192d) PFS in breast cancer with <i>BRCA</i> mutation (109 d) or without (54 d)	Fatigue 11% Dyspnoea 12%	(Gelmon et al, 2011)
II	<i>BRCA1</i> or <i>BRCA2</i> mutated ovarian cancer recurrent within 12 months of prior platinum therapy	Randomised 1:1:1 olaparib 200 (32 pts) or 400mg bid (32 pts) or PLD 50mg/m <sup>2</sup> (33pts)	PFS 6.5, 8.8 and 7.1 months HR 0.88, p=0.66 ORR 25%, 31% and 18% GCIC 34, 56 and 33%	Anemia 13% Fatigue 9% Nausea 6% 2 toxic death (CV accident, MDS syndrome)	(Kaye et al, 2012)
II	Platinum-sensitive relapsed high-grade EOC with two or more platinum-based	Maintenance therapy with olaparib 400mg bid (136 pts) versus placebo (129 pts). PFS as a primary EP	PFS median, 8.4 vs. 4.8 months; HR 0.35, 95% CI 0.25-0.49, p<0.001 OS interim analysis HR, 0.94; 95% CI, 0.63-1.39; p=0.75	Anemia 5.1%, Fatigue 6.6%	(Lederman et al, 2012)

**Table 2. Essais cliniques des I PARP en monothérapie: données publiées.**

Abréviations: bid, twice a day; 95% CBR, clinical benefit rate; CI, confidence interval; CV, cerebrovascular accident; d, daily; EOC, epithelial ovarian cancer; EP, endpoint; GI symptoms, gastrointestinal symptoms; HR, hazard ratio; MDS, myelodysplastic syndrome; OS, overall survival; OR, objective response rate; ORR, overall response rate; PD, pharmacodynamics; PFS, progression-free survival; pts, patients; RR, response rate; vs, versus; TNBC, triple negative breast cancer;

PARP I	Other therapeutic agents		Patient population	Trial design	Results	Grade 3/4 toxicity	Ref.
<b>Olaparib</b>	Dacarbazine	I	Advanced cancer, Expansion cohort with chemo-naïve melanoma	Dacarbazine (600-800 mg/m <sup>2</sup> ) d1, plus olaparib (20-200 mg) bid d1-d7, 21-day cycle (40 pts)	OTD dacarbazine 600mg/m <sup>2</sup> d1 plus olaparib 100mg bid d1-d7, 21-day cycle Tumor response: 2 PR, 8 SD, 30 PD	Lymphopenia 15% Neutropenia 23%	(Khan et al, 2011)
	Topotecan	I	Advanced solid tumors	Topotecan 0.5mg/m <sup>2</sup> /day, 3 days or 1mg/m <sup>2</sup> /day, 3 days, plus olaparib 50, 100 or 200 mg bid, d1=d21 (19 pts)	MTD Topotecan 1mg/m <sup>2</sup> /day 3days olaparib 100mg bid	Neutropenia	(Samol et al, 2012)
	CDDP and Gemcitabine	I	Advanced solid tumors	Olaparib 100mg bid d1-4 plus CDDP 60mg/m <sup>2</sup> d3 plus Gemcitabine 500mg/m <sup>2</sup> d3, d10 (23 pts)	MTD, Olaparib 100mg/m <sup>2</sup> d1 plus CDDP 60mg/m <sup>2</sup> d1 plus Gemcitabine 500 mg/m <sup>2</sup> d1, d8 Tumor response, 2 PR, 13 SD, 6 PD	Neutropenia 61% Lymphopenia 61% Thrombocytopenia 57%	(Rajan et al, 2012)
	Bevacizumab	I	Advanced solid tumors	Olaparib 100 (4pts), 200 (4pts) or 400 mg (4pts) bid plus bevacizumab 10mg/m <sup>2</sup> d1=d15	No DLT	None	(Dean et al, 2012)
	Carboplatin and Paclitaxel	II	Platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer	6x21d cycles P(175mg/m <sup>2</sup> d1)+C(AUC4 d1) + olaparib (200mg bid d1-10/21) (81 pts) then olaparib (400mg bid continuous) (66 pts), or 6x21d cycles P(175mg/m <sup>2</sup> d1)+C(AUC6 d1) (75 pts) then no further (55 pts)	PFS median, 12.2 vs. 9.6 months; HR, 0.51, 95% CI 0.34-0.77; p=0.0012; ORR, 64 vs 58% OS, immature (14% total events)	65 vs 57% during combination phase 29 vs 16% during maintenance	Oza, ASCO 2012, Abstract 5001
<b>Veliparib</b>	Topotecan	I	Advanced or refractory solid tumors, lymphoma	Topotecan IV varying schedules plus veliparib 10mg bid (24 pts)	MTD topotecan 0.6 mg/m <sup>2</sup> /d plus veliparib 10 mg bid d1-5, 21-day cycle tumor response: 8 SD	Neutropenia Thrombocytopenia	(Kummar et al, 2011)
	Cyclophosphamide	I	Refractory solid tumors and lymphoid malignancies	Metronomic dosing of cyclophosphamide d1-d21 plus veliparib d1-d7 or d1-d14 or d1-d21 (35 pts)	MTD, cyclophosphamide 50mg plus veliparib 60mg daily Tumor response: 8 PR, 6 SD	Lymphopenia	(Kummar et al, 2012)
<b>Rucaparib</b>	Temozolomide	I	Advanced solid tumors	Escalating doses of rucaparib plus temozolomide 100mg/m <sup>2</sup> (18 pts) or 200 mg/m <sup>2</sup> d1-d5, 28-day cycle, for an expansion cohort of metastatic malignant melanoma (15 pts)	PID 12mg/m <sup>2</sup> /d MTD temozolomide 200mg/m <sup>2</sup> /d d1-d5, 28-day cycle Tumor response: 1 CR, 2 PR, 6 SD	Thrombocytopenia Neutropenia	(Plummer et al, 2008)

	Temozolomide	II	Chemotherapy naïve metastatic melanoma	Rucaparib 12 mg/m <sup>2</sup> /d plus temozolomide 200mg/m <sup>2</sup> d1-d5, 28-day cycle, (46 pts)	RR, 17.4% TTP median, 3.5 months OS median, 9.9 months	Myelo-suppression requiring a 25% dose reduction of temozolomi	(Plummer et al, 2013)
<b>INO-1001</b>	Temozolomide	I	Unresectable stage III/IV melanoma	Escalating doses of INO-1001 plus temozolomide 200mg/m <sup>2</sup> d1-d5, 28-day cycle, (12 pts)	Tumor response: 1 PR, 4 SD, TTP median, 2.2 months OS median, 17 months Half live of INO-1001 mean, 5 hours	Thrombocytopenia Neutropenia Asthenia	(Bedikian et al, 2009)

**Table 3. Essais cliniques des I PARP en combinaison à la chimiothérapie: données publiées.**

Abréviations: bid, twice a day; C, carboplatin; CB, clinical benefit; CDDP, cisplatine; CR, complete response; DLT, dose limiting toxicity; EOC, epithelial ovarian cancer; MTD, maximal tolerated dose; ORR, overall response rate; OS, overall survival; OTD, optimal tolerated dose; P, paclitaxel; PD, progressive disease; PFS, progression free survival; PID, PARP inhibitory dose; PI3K, PI3kinase; PLD, Pegylated liposomal doxorubicin; PR, partial response; pts, patients; SD, stable disease; TTP, time to progression;

Références: (Dean et al, 2012; Khan et al, 2011; Rajan et al, 2012; Samol et al, 2012) (Oza AM et al, ASCO 2012 Abstract 5001) (Bedikian et al, 2009; Kummar et al, 2011; Kummar et al, 2012; Plummer et al, 2008; Plummer et al, 2013)

La première phase I rapportée par Fong en 2009 a suscité beaucoup d'espoir pour cette classe thérapeutique dans les cancers BRCA mutés notamment (Fong et al, 2009). Elle incluait 60 patients ayant un cancer du sein, de l'ovaire ou de la prostate, dont 22 étaient mutés BRCA. Un bénéfice clinique de 63% était retrouvé uniquement chez des patients BRCA mutés, ce pourquoi une cohorte supplémentaire de 50 patientes ayant un cancer épithéliale de l'ovaire (EOC) muté étaient incluses (Fong et al, 2010). Selon que les patientes étaient réfractaires (progression pendant le traitement), résistantes (intervalle sans platine (PFI) < 6mois) ou sensibles (PFI > 6 mois) au CDDP, elles avaient un taux de réponse de 23%, 45% et 69%. Donc pour des patientes BRCA mutées la réponse à l'olaparib corrélait avec la sensibilité au CDDP. Dans deux études de phases II testant deux doses d'olaparib, une dans le cancer de l'ovaire (Audeh et al, 2010) et une dans le cancer du sein (Tutt et al, 2010) BRCA mutés le bénéfice clinique était 66% et 52% respectivement pour la plus forte dose testée. Une autre étude de phase

Il évaluait l'olaparib (Gelmon et al, 2011) chez des patientes lourdement prétraitées et stratifiées selon leur mutation BRCA avec un EOC de haut grade séreux ou indifférencié (n=64) sous-types agressifs étant 'BRCAness' dans 50% des cas, ainsi que des patientes avec un cancer du sein triple négatif (TNBC) (n=26) qui est un phénotype particulièrement agressif survenant chez les femmes jeunes et qui sont mutés BRCA pour un % non négligeable (Pal et al, 2011). N'était retrouvée une réponse objective que pour les EOC qui étaient de 41% et 24% selon que les patientes étaient mutées ou non. On peut retenir que dans l'EOC de type 2 selon la nouvelle classification de Kurman (Kurman & Shih Ie, 2011), l'olaparib apporte une réponse objective significative même chez les patientes non mutées.

Dans une étude de phase II est évalué l'olaparib en maintenance après un traitement par sel de platine dans le EOC (Ledermann et al, 2012) qui améliore la survie sans progression (PFS) (médiane, 8.4 vs. 4.8 mois; HR, 0.35; 95% CI, 0.25-0.49; p<0.001 et PFS médiane, 12.2 vs. 9.6 mois; p=0.0012 respectivement) sans amélioration de la survie globale à ce jour. La réponse était d'autant meilleure que les tumeurs étaient sensibles au CDDP et BRCA mutées. Une étude de maintenance est en cours dans le CBNPC après un traitement par sel de platine (Oza AM, ASCO 2012, abstract 5001).

Une seule étude à ce jour a randomisé l'olaparib en monothérapie versus le Caelyx (aussi connu sous doxorubicine pegylée liposomale) chez des patientes mutées BRCA avec un EOC lourdement prétraités et une réponse limitée aux sels de platine (PFI<12 mois) (Kaye et al, 2012). Il n'y a pas de différence en PFS (PFS, 6.5, 8.8 and 7.1 mois respectivement; HR=0.88; 95% CI, 0.51 to 1.56; p=0.66) pour deux doses d'olaparib (200 et 400mg/j) ou l'anthracycline respectivement même si les taux de réponses sont sensiblement meilleurs (25 %, 31% and 18% respectivement). Il y probablement plusieurs remarques à apporter à cette étude: (i) les tumeurs BRCA mutées sont connues pour être particulièrement sensibles aux anthracyclines (Graeser et



al, 2010) pouvant minorer l'effet des I PARP dans cette étude, et (ii) la réponse aux I PARP corrèle avec la réponse au CDDP en cas de mutation BRCA, hors dans cette étude les patients avaient toutes une réponse intermédiaire ou une résistance relative au CDDP (Fong et al, 2010), (iii) les patientes étaient lourdement prétraitées et ont pu récupérer une fonction HRR (Edwards et al, 2008; Sakai et al, 2008) et finalement (iiii) les tumeurs BRCA mutées étant particulièrement sensibles à la chimiothérapie et notamment au CDDP ainsi qu'aux thérapies ciblées et notamment aux I PARP, le plus licite serait probablement de faire un traitement combiné dans cette indication.

A noter que dans toutes ces études de monothérapie la tolérance de l'olaparib est excellente avec des effets secondaires mineurs de grade 1/2 (e.g. fatigue, symptômes gastro-intestinaux et anémie).

Pour les essais évaluant la combinaison des I PARP à la chimiothérapie, la limite majeure est la myélotoxicité nécessitant une adaptation de doses de la chimiothérapie notamment (Rajan et al, 2012). Des données de phase I et II de l'association du rucaparib ou veliparib avec le temozolomide notamment dans le traitement du mélanome métastatique en première ligne sont tout à fait encourageant (Plummer et al, 2008; Plummer et al, 2013). L'association du veliparib à l'endoxan métronomique est bien tolérée en phase I et est actuellement testée dans un essai de phase II pour des EOC mutés BRCA, des TNBC et des lymphomes de bas grade (Kummar et al, 2012). Pour ce qui est de l'association avec les thérapies ciblées nous avons des données de phase I pour l'avastin® (bevacizumab), anticorps monoclonal ciblant le VEGFR qui ne rapportent pas de toxicités limitantes (Dean et al, 2012). Par ailleurs, d'autres phases I sont en cours testant l'association des I PARP avec (i) le BKM120, un inhibiteur de PI3K dans les rechutes de EOC de haut grade et les TNBC (NCT01623349), (ii) le cediranib, un TKI VEGFR, dans les EOC et cancer du sein (NCT01116648), (iii) le bevacizumab associé au carboplatine et paclitaxel dans les EOC (NCT00989651), (iiii) le dinaciclib, un inhibiteur du CDK en association au

carboplatine dans les tumeurs solides avancées (NCT01434316) et (iiii) le rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20 associé à la bendamustine hydrochloride dans les hémopathies malignes (NCT01326702) ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

Malgré les espoirs certains suscités par les inhibiteurs de PARP, leur développement n'est qu'à ses débuts. Le design des essais futurs est essentiel pour le succès de cette classe thérapeutique en oncologie. En effet les essais en cours actuellement ne ciblent une population spécifique (e.g. mutation BRCA, EOC séreux de haut grade, TNBC) susceptible de répondre aux I PARP que dans 39% des cas (**Figure 6.C.**) et très peu d'essais prévoient l'analyse de biomarqueurs. Par ailleurs les surrogate marqueurs cliniques de déficience de la HRR sont certainement trop peu précis. En effet nous avons vu que la moitié seulement des EOC séreux de haut grade étaient BRCAness et seulement 20% des TNBC sont mutés BRCA (Gonzalez-Angulo et al, 2011). Il va donc sans dire que le challenge majeur est de valider des biomarqueurs spécifiques du 'BRCAness'.

## **2.5. Les biomarqueurs prédictifs de la réponse aux inhibiteurs de PARP**

Plusieurs biomarqueurs de la fonctionnalité de la HRR ont été rapportés. La limite pour certains est qu'ils nécessitent un essai fonctionnel, c'est-à-dire qu'ils nécessitent une induction de dommage à l'ADN.

Ainsi la formation de foci nucléaires RAD51 a été étudiée *in vitro* après traitement par le rucaparib sur des cellules d'EOC obtenues à partir de culture primaires d'ascite (Mukhopadhyay et al, 2010). La présence de RAD51, étant le reflet du déclenchement de la HRR, elle anti-corrélaait avec la réponse cytotoxique *in vitro* à l'inhibition de PARP. Cependant, aucune corrélation avec le devenir clinique des patientes n'a été établie. Ce même marqueur a été analysé sur des tissus de cancers du sein en immunofluorescence après traitement néo-adjuvant

des patients par les anthracyclines des patientes (Graeser et al, 2010). La réponse pathologique complète corrélait avec la fonctionnalité de la HRR. L'autre limite du marqueur est qu'il est cycle dépendant et survient uniquement en phases S et G2 de cellules proliférantes (Graeser et al, 2010).

Récemment, la PARP-1 binding protein PARPBP (connue aussi sous le nom PARI or CI2orf48) a été rapportée comme étant surexprimée dans des lignées d'adénocarcinome du pancréas (Kashiwaya et al, 2009). PARPBP activerait PARP1 et inhiberait la HRR (O'Connor et al, 2013; Piao et al, 2011) pouvant ainsi être envisagé comme un biomarqueur prédictif. Par ailleurs, des données *in vitro* rapportent une hyperactivation de PARP1 dans des lignées HRR déficientes (e.g. les lignées de hamster V-C8 et humaine CAPAN1) (Gottipati et al, 2010). De plus le knockdown de protéines essentielles de la HRR (e.g., RAD54, RAD52, BLM, WRN, XRCC3) dans des lignées humaines d'ostéosarcome induisent une déficience de la HRR, une hyperactivation de PARP et une sensibilisation aux I PARP.

Finalement, l'instabilité génétique présente dans les tumeurs HRR déficientes (i.e. par mutation de BRCA1/2, par méthylation du promoteur de BRCA, par perte d'hétérozygotie (LOH) du gène BRCA1/2 ou par amplification de EMSY) pourrait être mesurée (e.g. par CGH array ou LOH) et scorée à des fins de biomarqueurs (Birkbak et al, 2012; Stefansson et al, 2009). C'est ainsi qu'un score de déficience de la HRR (HRD score) a été établi à partir de données de LOH (Abkevich et al, 2012) validé dans deux cohortes d'EOC.

*C'est dans ce contexte d'ébullition autour des inhibiteurs de PARP que nous nous sommes en particulier intéressés au développement des ces derniers dans le cancer bronchique en monothérapie et en association à la drogue majeure qui est le cisplatine (CDDP). Les cancers bronchiques restant de mauvais pronostique malgré les avancées de la biologie moléculaire dans cette pathologie. Etant donné que l'échappement au CDDP est un virement péjoratif dans l'évolution du cancer bronchique notamment mais également dans d'autres cancers solides comme le cancer de l'ovaire par exemple, nous nous sommes en particulier intéressés à la réponse aux inhibiteurs de PARP dans ce stade agressif de la maladie qu'est la chimiorésistance au CDDP.*

## Résultats

### **1. La résistance au CDDP associée à l'hyperactivation de PARP.**

(Michels et al, 2013a)

#### **1.1. L'interaction de l'inhibition de PARP et du CDDP dans le cancer bronchique non à petites cellules.**

Nous avons réalisé un screening à haut débit de 1040 drogues autorisées pour la mise sur le marché aux Etats-Unis par la Food and Drug Administration (FDA) en association avec un inhibiteur de PARP PJ34 hydrochloride (PJ) disponible dans le commerce. Par une technique de microscopie à fluorescence robotisée avec une analyse automatique de la condensation des noyaux marqués au fluorochrome Hoechst 33342 après 48h de traitement, nous avons évalué la mort des cellules A549 de cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC). Cette méthode a permis de mettre en évidence plusieurs alkylants qui sont cytotoxiques uniquement en cas d'association avec le PJ (e.g. le Cisplatine CDDP, la dacarbazine, la mytomycine C et le thiotepa). Nous nous sommes intéressés à l'effet combiné avec le CDDP et l'avons validé avec un inhibiteur de PARP actuellement en cours de développement clinique CEP8983 (CEP) (i.e. CEP9722 étant la prodrogue) par la même technique dans une expérience indépendante.

#### **1.2. Mort sélective des lignées humaines cancéreuses résistantes au CDDP induite par les inhibiteurs de PARP.**

Dans le laboratoire, nous avons développé des clones résistants au CDDP à partir de la lignée parentale A549 cultivée pendant plusieurs mois en présence de faibles concentrations de CDDP.

Nous avons ainsi obtenu 9 clones (R1 à R9) avec une résistance acquise au CDDP par pression sélective et qui est stable après retrait du CDDP du milieu de culture. Etant donné que ce modèle rappelle la réalité des patients atteints de CBNPC avancé, c'est-à-dire une rechute inéluctable après une réponse initiale au CDDP, nous nous sommes intéressés à l'intérêt des inhibiteurs de PARP dans ce contexte. De façon inattendue, nous avons pu noter un effet cytotoxique de PJ ou CEP dans un nombre non négligeable de clones résistants au CDDP (e.g. 5 clones montraient une sensibilité importante, 2 avaient une réponse intermédiaire et 2 restaient résistants aux inhibiteurs de PARP) comparativement à la lignée parentale. Nous avons quantifié la mort induite après 48H de traitement par une technique de cytométrie de flux avec des sondes fluorescentes adaptées permettant d'évaluer la chute précoce du potentiel membranaire de la mitochondrie (DiOC<sub>6</sub>(3) 3,3'-dihexiloxalocarbocyanine, émission à 501nm, fluorescence verte) ainsi que la perméabilisation de la membrane plasmique (IP iodure de propidium, émission à 617nm, fluorescence rouge), qui sont des étapes essentielles de l'apoptose. Cet effet des inhibiteurs pharmacologiques a pu être reproduit par 3 petits ARN interférents (siRNA) spécifiques de PARP1. Par ailleurs, la résistance au CDDP ainsi que la sensibilisation aux inhibiteurs de PARP des clones R ont été confirmées par le test de clonogénicité. Ces résultats montrent pour la première fois que la résistance acquise au CDDP prédispose fréquemment à une sensibilisation à l'inhibition de PARP dans un modèle de CBNPC.

### **1.3. L'hyperactivation de PARP exprimée par les polymères de Poly(ADP)ribose (PAR) prédit la réponse aux inhibiteurs de PARP.**

Afin de comprendre la sensibilisation à l'inhibition de PARP des cellules résistantes au CDDP nous avons évalué par la technique du Western Blot l'expression protéique de PARP1 ainsi que son activité enzymatique par la détection des polymères de Poly(ADP) ribose (PAR) associés

aux protéines. Nous avons pu constater que PARP1 et PAR étaient stablement surexprimés dans les clones résistants (PARP<sup>high</sup>, PAR<sup>high</sup>) par rapport à la lignée parentale. Par ailleurs, PARP1 était fortement activée après traitement aigu (24h) par le CDDP dans la lignée parentale. Dans tous les cas, PAR disparaissait après traitement par PJ et CEP (24h). Dans ce contexte, nous avons testé d'autres lignées de cancer humains pour lesquelles nous disposions du couple cellules parentales - cellules générées résistantes au CDDP (suivant le procédé précédemment décrit). Ainsi, nous avons testé 3 autres lignées de CBNPC (H1650, H460, H1299), 1 lignée de mésothéliome (P31), de EOC (TOV112D) et de cancer du col de l'utérus (HeLa). Pour 5 des 6 couples, nous avons retrouvé les mêmes résultats à savoir une hyperactivation de PARP dans la lignée résistante au CDDP associée à une sensibilisation aux inhibiteurs de PARP. Il est à noter que l'hyperactivation de PARP est plus constante que l'hyperexpression de PARP1, suggérant que l'activité de PARP est un marqueur plus sensible que son expression. Dans ce contexte, nous avons mis au point une technique d'immunohistochimie pour la détection de PAR sur des culots cellulaires inclus en paraffine, en particulier en montrant une inhibition de PAR par les inhibiteurs de PARP ainsi que par un siRNA spécifique de PARP1. Par ailleurs, nous avons montré un ralentissement significatif de la croissance tumorale des xénogreffes d'un clone A549 PAR<sup>high</sup> chez des souris nues avec un traitement par PJ en monothérapie comparativement à celle des xénogreffes issues de la lignée parentale. Les xénogreffes recueillies à la fin de l'expérience ont été inclus en paraffine. Celles issus des clones PAR<sup>high</sup> provenant des souris contrôles non traitées expriment fortement la PAR en IHC, alors que celles des souris traitées avec PJ ont perdu leur expression. Ainsi l'hyperactivation de PARP semble être un biomarqueur stable et prédictif de la cytotoxicité induite par les inhibiteurs de PARP.

#### **1.4. Les mécanismes de mort induite par les inhibiteurs de PARP.**

Nous avons évalué l'endommagement de l'ADN dans les cellules à travers la quantification des faucilles nucléaires de  $\gamma$ -H2AX en immunofluorescence. Constitutivement ces dernières étaient sensiblement plus élevées dans les clones résistants au CDDP comparativement aux cellules parentales. Après 6h de traitement par les inhibiteurs de PARP, le pourcentage de cellules présentant des faucilles  $\gamma$ -H2AX était significativement plus accru pour les clones résistants au CDDP comparativement à la lignée parentale. Et les faucilles persistaient en cas d'association de ZVAD-fmk, un inhibiteur ubiquitaire des caspases, montrant que les faucilles n'étaient pas la conséquence tardive de l'apoptose mais bien une réponse précoce à l'endommagement de l'ADN induit par les inhibiteurs de PARP.

En revanche, la cytotoxicité induite par l'inhibition de PARP après 24h était liée à l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose étant donné que nous avons pu notifier (i) un relargage accru de cytochrome *c* mitochondrial vers le cytoplasme, (ii) une activation de caspase 3 quantifiés par immunofluorescence ainsi qu'(iii) une inhibition de la mort par le ZVAD-fmk mesurée par cytométrie de flux.

Ces résultats suggèrent que comparativement à la lignée parentale, les clones résistants au CDDP présentent d'avantage d'endommagements de l'ADN les rendant dépendant à l'activité de PARP1.

#### **1.5. Les déficits en réparation de l'ADN des lignées sensibles aux inhibiteurs de PARP.**

Dans ce contexte d'hypersensibilité aux inhibiteurs de PARP accompagné d'une augmentation de l'activité PARylante pour les lignées résistantes au CDDP, nous avons recherché une déficience intrinsèque d'une voie de réparation de l'ADN. En premier lieu, nous avons évalué la



fonctionnalité de la HRR. Nous avons analysé l'activation des faucilles BRCA1 et RAD51 après traitement par inhibiteurs de PARP et  $\gamma$ -irradiation. Nous n'avons pas trouvé de différence d'activation de la HRR entre les lignées sensibles et résistantes au CDDP. Etant donné que PARP est impliquée dans l'activation d'autres voies de réparation, notamment la BER, nous avons testé l'initiation (i.e. l'activité des endonucleases) et l'élongation (i.e. la réparation notamment par les polymérase) de cette voie. Nous n'avons pas retrouvé de défaut dans les premières étapes du BER, cependant nous avons détecté une diminution d'expression de XRCC1 ainsi que de la polymérase  $\beta$ , acteurs de la phase terminale du BER, dans les clones résistants au CDDP qui sont sensibles aux inhibiteurs de PARP. Ceci suggère qu'il existait probablement un degré de déficit des voies de réparation de l'ADN, notamment le BER, à l'origine d'une hyperactivation et d'une dépendance à PARP dans un certain nombre de lignées ayant une résistance acquise au CDDP. Par ailleurs les lignées sensibles aux inhibiteurs de PARP étaient tuées préférentiellement par le temozolomide (TMZ) comparativement aux lignées parentales. Les lignées cellulaires déficientes en BER sont connues pour être sensibilisées à l'induction de la mort par le TMZ (Horton et al, 2008).

## **2. Effet synergique des inhibiteurs de PARP et du CDDP. Indépendance par rapport au p53.**

(Michels et al, 2013b)

Nous avons rapporté dans l'étude précédente les résultats d'un screening à haut débit de 1040 drogues approuvées par la FDA associé ou non au PJ. Nous nous sommes plus particulièrement penché sur l'effet d'une combinaison des inhibiteurs de PARP avec le CDDP. Par la technique colorimétrique du clivage du sel WST-1 évaluant l'activité métabolique des cellules et donc la viabilité et/ou la prolifération cellulaire nous avons testé de larges gammes de concentrations de CDDP en association avec le PJ ou CEP. Par des méthodes mathématiques selon Harbron (Harbron, 2010), nous avons calculé un index de combinaison (IC) qui nous a permis de conclure à un effet synergique (IC inférieur à 0,8). Cet effet synergique est particulièrement convainquant pour l'association avec CEP qui est en cours de développement clinique.

Afin de valider l'effet combinatoire, nous avons évalué des événements cellulaires précoces (i.e. réponse à l'endommagement de l'ADN par les faucilles  $\gamma$ -H2AX) et tardifs (i.e. le test de clonogénicité). En effet, nous avons pu mesurer l'induction des lésions doubles brins de l'ADN par le comptage des faucilles nucléaires  $\gamma$ -H2AX en immunofluorescence. L'endommagement de l'ADN induit par l'association CEP+CDDP était significativement plus élevé que la somme des dommages induits par chacune des drogues seules. Par ailleurs, la capacité de clonogénicité des cellules A549 était significativement altérée par l'association du CDDP aux inhibiteurs de PARP.

Afin de déterminer le type de mort induite, nous avons quantifié par cytométrie de flux les cellules mourantes ( $\text{DiOC}_6(3)^{\text{lowPI}}$ ) ainsi que les cellules mortes ( $\text{PI}^+$ ). La mort cellulaire ainsi induite par la combinaison du CDDP aux inhibiteurs pharmacologiques de PARP a pu être reproduite par une association du CDDP à 3 siRNA spécifiques de PARP-1 signant l'implication

de la protéine PARylante dans l'effet synergique observé. Etant donné la dépolarisation précoce de la membrane mitochondriale dans la réponse cytotoxique à la combinaison des drogues, nous avons poussé l'exploration de la voie mitochondriale de l'apoptose et avons quantifié par immunofluorescence le relargage cytoplasmique du cytochrome *c* mitochondriale suivi de l'activation de la caspase 3. De plus, nous avons inhibé la cytotoxicité cellulaire synergique du CDDP et des inhibiteurs de PARP par l'utilisation de ZVAD-fmk, un inhibiteur à large spectre des caspases. Ces deux dernières expériences permettaient de conforter le diagnostic de l'implication de la voie intrinsèque de l'apoptose dans la toxicité synergique du CDDP avec les inhibiteurs de PARP. Après avoir réalisé ces expériences sur la lignée A549, nous avons choisi 3 autres lignées humaines de CBNPC qui ont la particularité d'avoir le gène suppresseur de tumeur p53 altéré (i.e. H358 *TP53*<sup>-/-</sup>, H522 avec forme tronquée de p53 non fonctionnelle et H226 qui a un statut p53 controversé) (Berglind et al, 2008). L'apoptose induite par des doses suboptimales de CEP et PJ en association avec le CDDP a montré pour ces trois lignées cellulaires que l'absence de p53 n'affectait pas la cytotoxicité coopérative du CDDP et des inhibiteurs de PARP.

En conclusion, nous avons montré *in vitro* que le CDDP peut être avantageusement combiné aux inhibiteurs de PARP pour tuer des lignées humaines de CBNPC par activation de la voie intrinsèque de l'apoptose indépendamment du statut p53.

## Discussion et perspectives

### **1. L'intérêt d'associer les inhibiteurs de PARP aux autres cytotoxiques.**

Nous avons noté un effet synergique voire supra-additif pour deux inhibiteurs pharmacologiques de PARP ainsi que le knockdown spécifique de PARP1 avec le CDDP dans des lignées humaines de CBNPC insensibles à la monothérapie par I PARP. Etant donné que le CDDP est une chimiothérapie majeure en oncologie utilisée dans de nombreux cancers (e.g. ORL, digestifs, bronchique, ovarien, testiculaires, vésicaux), potentialiser son effet permettrait de diminuer ses doses administrées et par la même occasion ses toxicités induites (e.g. nephro-, oto- et neurotoxicité), ce qui semble tout à fait attrayant. A noter que 42% des essais cliniques en cours évaluant l'association des I PARP à d'autres chimiothérapies évaluent l'association au CDDP (**Figure 6**) (<http://www.clinicaltrials.gov/>).

### **2. L'hyperPAR(ylation) protéique et la résistance au CDDP.**

Nous avons noté qu'un nombre non négligeable de clones cellulaires humains de cancer bronchiques, ovarien, cervical et pleural résistants au CDDP présentaient une hyperactivation de PARP1. Même si cela est très intrigant nous n'avons pas validé un nouveau marqueur prédictif de résistance au CDDP étant donné qu'il y avait des clones résistants au CDDP qui n'exprimaient pas d'hyperPARylation. Etudier des cohortes de patients atteints de cancers pour lesquels le CDDP est une ligne thérapeutique majeure comme le cancer épithélial de l'ovaire ou le cancer du testicule permettrait de pousser la compréhension de la signification de la PARylation des tissus tumoraux et ses liens avec la réponse au CDDP. Par ailleurs, étant donné qu'il y a des données précliniques convaincantes sur la potentialisation de la radiothérapie par les

inhibiteurs de PARP, étudier la PARylation des tumeurs avant voire après radiochimiothérapie p.ex sur une cohorte de cancer épidermoïde du col de l'utérus ou du canal anal permettrait d'étudier une éventuelle valeur prédictive de ce marqueur dans ce contexte clinique essentiel. C'est dans cette direction de recherche translationnelle que nous souhaitons poursuivre l'étude de la PARylation des cancers.

De plus, étant donné que nous avons noté une hyperactivation de PARP induite de façon aiguë après traitement par CDDP, mais également de façon pérenne après traitement chronique nous sommes convaincus qu'un traitement de maintenance par I PARP après un traitement initial avec du platine a tout son intérêt et est d'ailleurs actuellement en cours de développement clinique.

### **3. Les inhibiteurs de PARP1 Ange ou Démon: La prévention ou la génération de cancers.**

Etant donné que PARP1 est impliqué dans la stabilité génétique et que les souris PARP1<sup>-/-</sup> knockout développent spontanément des tumeurs, on peut s'interroger sur les risques que l'on prend avec les inhibiteurs de PARP du moins pour les tissus normaux. En effet, les inhibiteurs de PARP étant une thérapeutique récente les effets secondaires tardifs restent inconnus.

En sachant que, le bénéfice risque sera évalué comme pour les autres thérapeutiques anti-tumorales en fonction du pronostic du patient.

Pour les tissus tumoraux, l'hyperactivité de PARP pouvant être le reflet d'une dépendance à PARP secondaire à un déficit en réparation de l'ADN (e.g. HRR ou phase terminale du BER) (Gottipati et al, 2010; Michels et al, 2013a; O'Connor et al, 2013), elle permet une létalité synthétique avec les inhibiteurs de PARP.

Ainsi selon que le tissu est normal ou tumoral, le déficit ou l'hyperactivation de PARP est le reflet d'une instabilité génétique. A noter que les tankyrases 1 et 2 (connus également sous le

nom de PARP5a et PARP5b) sont impliquées et dans la stabilité génétique de par leur interaction avec les centrosomes au niveau du fuseau mitotique, mais également dans des voies oncogéniques (i) par l'activation de la voie WNT et donc de l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que (ii) la maintenance des télomère, phénomène à l'origine d'une longévité cellulaire (Riffell et al, 2012). Les tankyrases ayant également une activité de PARylation, des inhibiteurs spécifiques des tankyrases sont actuellement développés (Busch et al, 2013).

Par ailleurs, il est décrit que l'activité de PARP est plus importante dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales (Zaremba et al, 2009), phénomène qui est plutôt rassurant pour une cytotoxicité sélective des inhibiteurs de PARP au niveau des cellules tumorales.

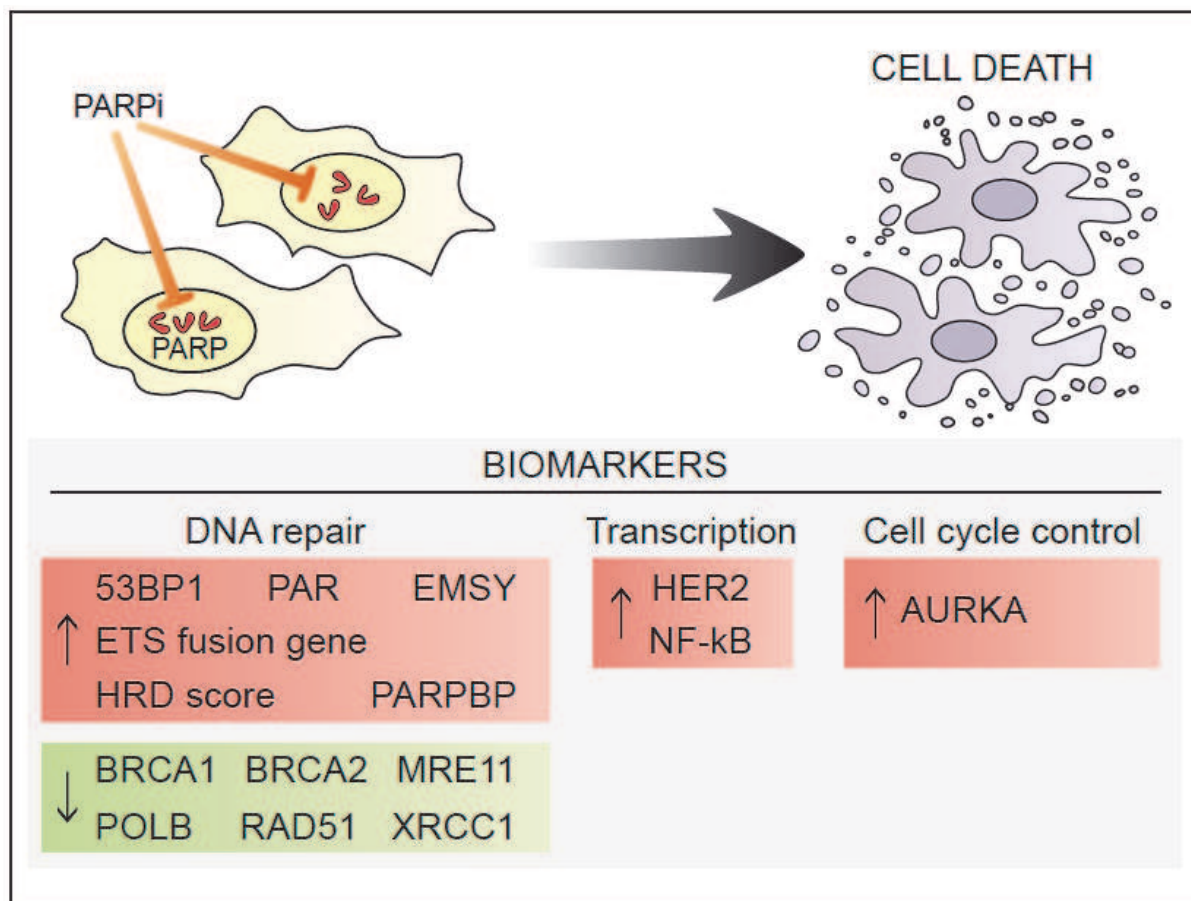
Finalement, PARP ayant des rôles autres que dans la réparation de l'ADN, son inhibition pourrait être bénéfique dans la prévention du cancer. Notamment sa fonction dans la médiation de l'inflammation gastrique chronique secondaire à l'infection par l'*Helicobacter pylori* qui contribuerait au développement des adénocarcinomes gastriques. Les inhibiteurs de PARP seraient d'un certain intérêt dans la prévention de ce type de cancer pour des patients infectés de façon chronique (Toller et al, 2010).

#### **4. PAR un biomarqueur prédictif de la réponse aux inhibiteurs de PARP.**

Afin d'assurer le succès du développement clinique des I PARP notamment en monothérapie, il est essentiel de valider des biomarqueurs prédictifs (**Figure 7**). Nous avons noté une corrélation constante entre l'hyperactivation de PARP exprimée par PAR ( $PAR^{high}$ ) et la sensibilité à deux inhibiteurs pharmacologiques de PARP ainsi qu'au knockdown de PARP1 pour toutes nos lignées de cancers humains bronchique, ovarien, pleural et cervical. Nous pensons par ailleurs que PAR est le reflet d'une dépendance cellulaire à PARP1. Etant donné que nous avons trouvé

une diminution de l'expression de deux acteurs du BER (i.e. la polymérase  $\beta$ , XRCC1) dans les cellules PAR<sup>high</sup>, nous pensons que ce déficit pourrait expliquer la PARylation compensatrice. Ainsi, les I PARP induirait une cytotoxicité sélective des cancers déficients en réparation de l'ADN. Ceci va dans le même sens que la sensibilité des cancers déficients en HRR qui expriment également une PARylation accrue (Gottipati et al, 2010). D'ailleurs plusieurs mécanismes différents responsables d'une déficience en HRR sont décrit comme étant à l'origine d'une PARylation: la mutation BRCA, le déficit en MRE11 (Fraser et al, 2012), l'inhibition pharmacologique de PI3K (Ibrahim et al, 2012; Juvekar et al, 2012), ou la downrégulation de différentes protéines du HRR (e.g. BLM, RAD51, RAD51, RAD54, WRN, XRCC3, BRCA2) (Gottipati et al, 2010) (**Figure 8**). Par ailleurs cette PARylation qui sensibilise aux I PARP est présente après induction de lésions de l'ADN (e.g.  $\gamma$ H2AX) (Farmer et al, 2005). A noter qu'il n'y a pas de corrélation directe entre l'expression et l'activité de PARP1 (Zaremba et al, 2009). D'ailleurs, la réponse aux I PARP corrèle plutôt avec l'activité que l'expression de PARP1 (Michels et al, 2013a).

PAR peut être mesuré par différentes techniques, (i) le western blot, (ii) l'immunohistochimie (Michels et al, 2013a), (iii) l'immunofluorescence (Gottipati et al, 2010) (iiii) des kits colorimétriques ou chemiluminescents commerciaux (Gottipati et al, 2010) et (iiii) par la spectrométrie de masse (Martello et al, 2013). Pour une application clinique, la technique d'immunohistochimie est probablement la plus simple à réaliser sur des tissus inclus en paraffine.

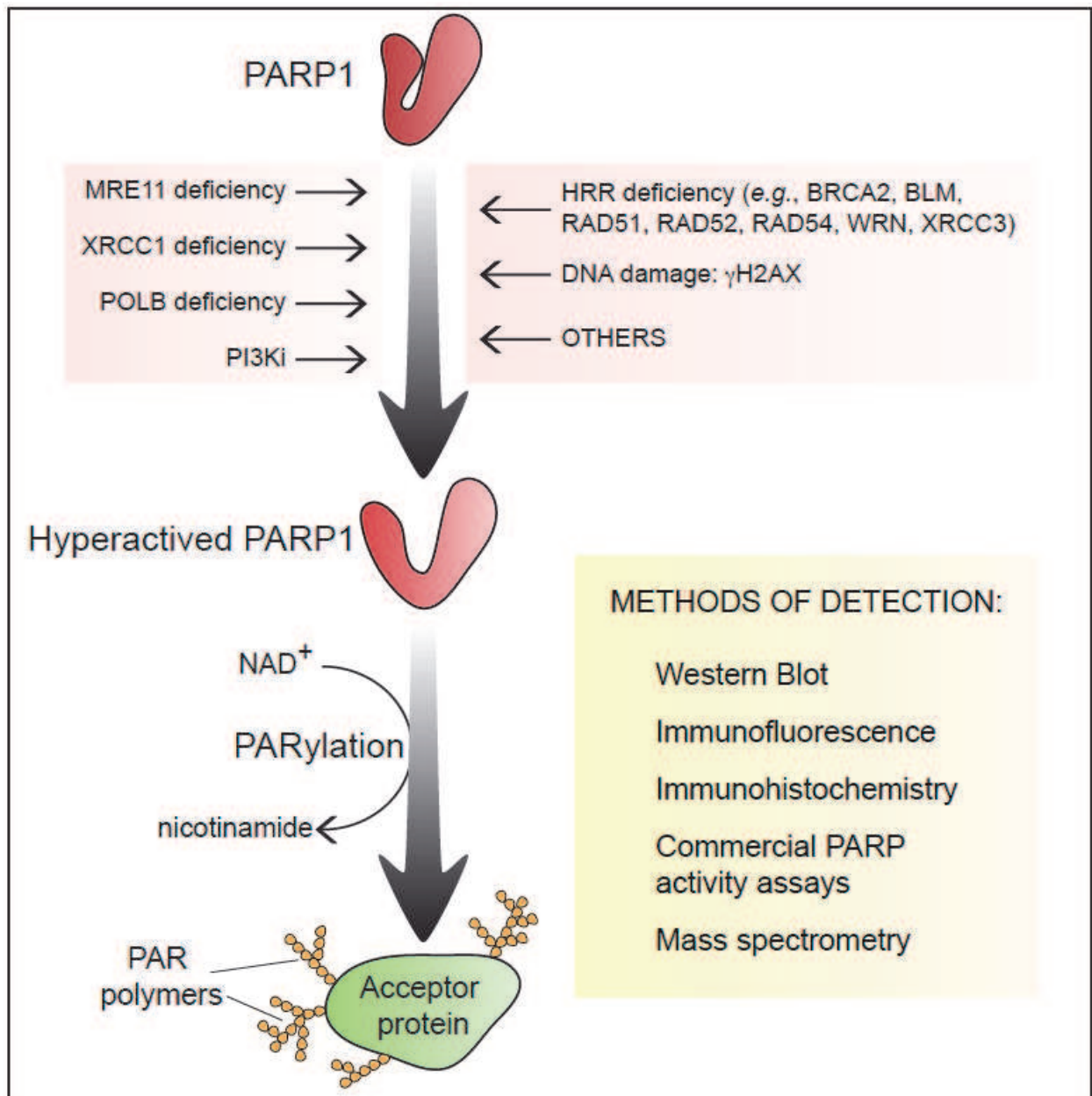


**Figure 7. Les biomarqueurs prédictifs de la réponse aux inhibiteurs de PARP.**

Une déficience du HRR implique une hyperactivation de PARP exprimée par PAR et une sensibilisation aux I PARP. Certains phénotypes autres que ceux secondaires à une mutation de BRCA1/2 sont à l'origine d'une déficience du HRR. Les gènes EMSY et transcrits de fusion ETS interagissent avec le BRCA2 pour l'inhiber. Le 53BP1 est un facteur de réponse aux lésions de l'ADN et est en équilibre avec le BRCA1 afin de déclencher la réparation double brin. Sa perte en cas de mutation BRCA1 est à l'origine d'une reprise du HRR causant la résistance aux I PARP. L'instabilité génétique corrèle avec la déficience du HRR ce qui a permis de déterminer un score de corrélation. La surexpression de PARPBP observée dans les cancers du pancréas est à l'origine d'une instabilité génétique et d'une hyperactivation de PARP. MRE11 interagit au niveau de la fourche de réplication en amont du HRR. Le RAD51 est un acteur principal du HRR. Aurora A a un rôle essentiel dans la régulation de la mitose et du cycle cellulaire et est fréquemment surexprimé dans des tumeurs, à l'origine d'une inhibition du RAD51. Par ailleurs la sous-expression de la polymérase  $\beta$  et de XRCC1 qui sont des effecteurs du BER est probablement à l'origine d'une hyperactivation de PARP. La surexpression du HER2 tout comme l'hyperactivation de PARP sont à l'origine d'une surexpression du facteur de transcription NF- $\kappa$ B impliqué dans la réponse immunitaire.

Abréviations : Aurora A, AURKA; BER, base excision repair; 53BP1, p53-binding protein-1; BRCA, breast cancer gene; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; HRD score, homologous recombination deficiency score; HRR, homologous recombination repair; I PARP, inhibiteurs de PARP; MRE11, meiotic recombination protein 11; NF- $\kappa$ B, Nuclear factor-kappa B; PAR, poly-(ADP-ribose); PARPBP, poly-(ADP-ribose) polymerase binding protein; POLB, polymérase  $\beta$ ; XRCC1, X-ray repair cross-complementing 1.





**Figure 8. L'hyperactivation de PARP.**

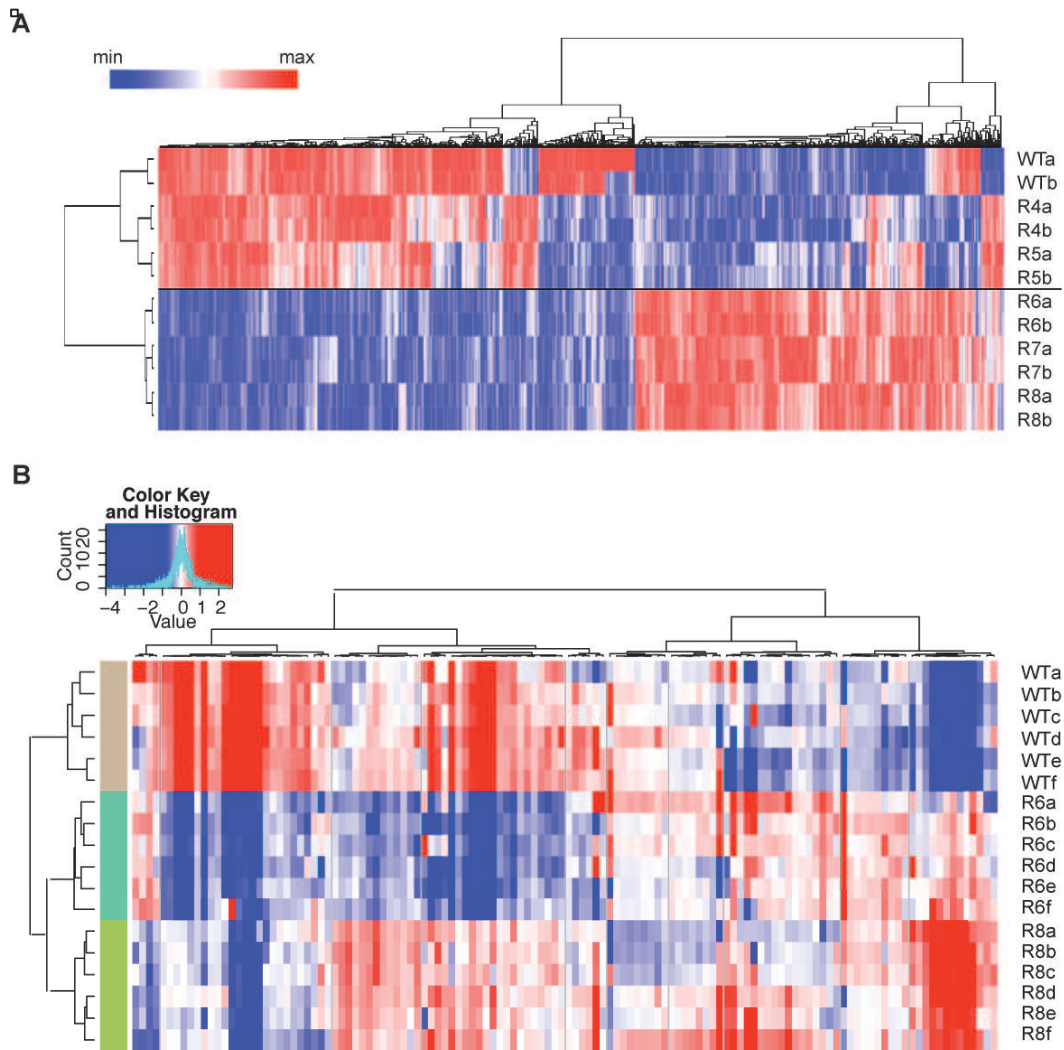
Des données précliniques rapportent que l'hyperactivation de PARP exprimée par les polymères PAR est le reflet compensateur d'une déficience chronique en réparation de l'ADN ou la réponse aigue à une lésion de l'ADN (boîte rouge). PAR peut être détecté selon différentes méthodes expérimentales (boîte jaune).

Abréviations : BRCA, breast cancer gene; HRR, homologous recombination repair; MRE11, meiotic recombination protein 11;  $NAD^+$ , nicotinamide dinucleotide; PAR, poly-(ADP-ribose); PI3K, Phosphoinositide 3-kinase; POLB, polymérase  $\beta$ ; XRCC1, X-ray repair cross-complementing 1.

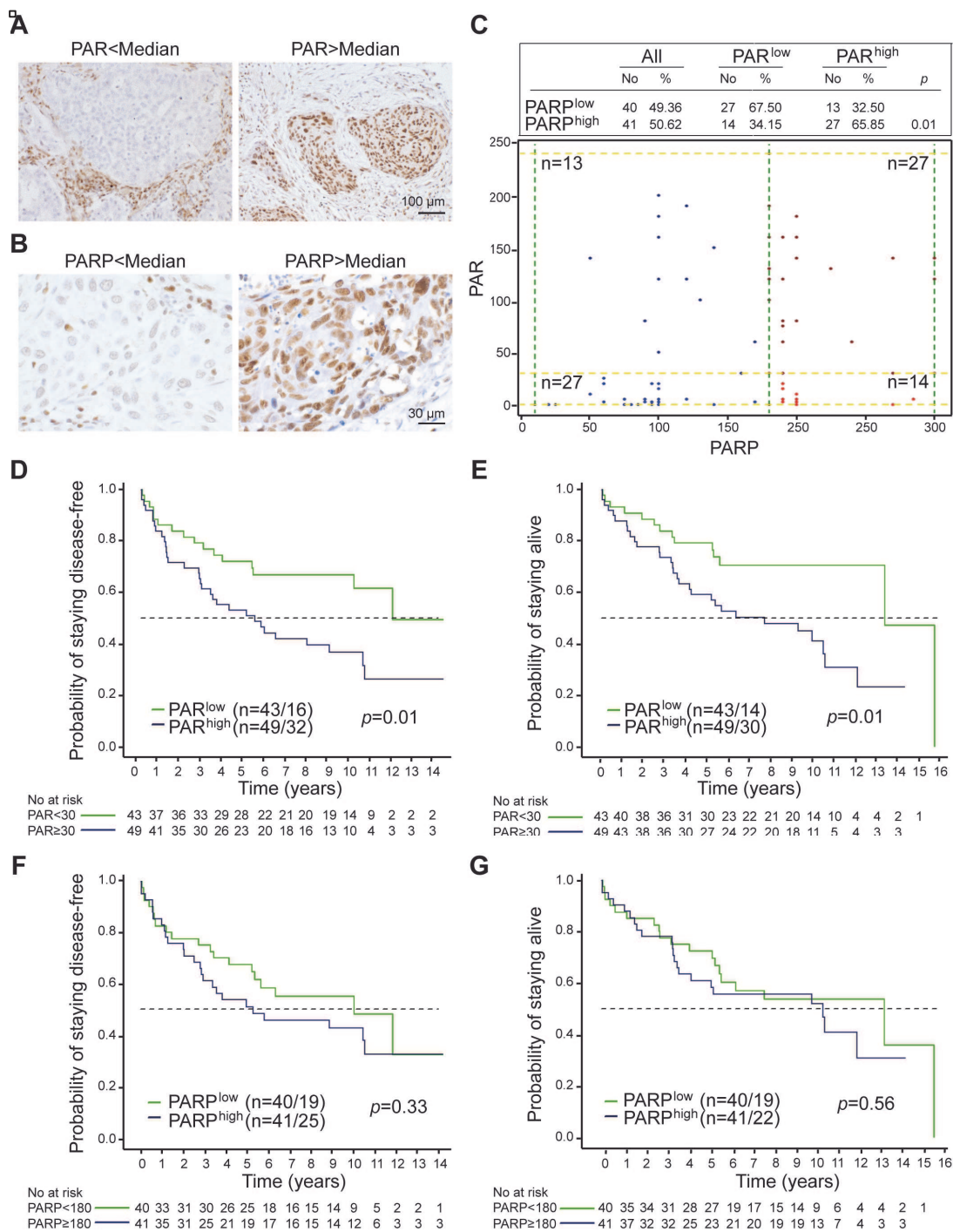
## 5. La classification des tumeurs en PAR<sup>low</sup> et PAR<sup>high</sup>

Dans cette section, nous allons vous rapporter des données très préliminaires qui suscitent pourtant suffisamment d'intérêt pour les rapporter à ce stade. En effet nous avons étudié le transcriptome et le métabolome de la lignée A549 et ses clones résistants au CDDP (**Figure 9**). De façon intrigante à partir d'une clusterisation de façon non hiérarchisée nous pouvons détecter des clusters de gènes et de métabolites respectivement qui permettent de distinguer et de classer les clones en deux sous-populations selon leur quantité de protéines PARylées. Ceci ne manque pas de suggérer l'influence de PARP1 sur l'activité cellulaire. Une analyse détaillée de la représentativité fonctionnelle de ces clusters sera un travail nécessaire avant de pouvoir en tirer de quelconques conclusions. Par ailleurs, ce type d'approche devrait permettre de mettre en évidence de nouveaux marqueurs de sensibilité aux inhibiteurs de PARP.

C'est dans ce même objectif que nous avons mis au point et procédé à une analyse immunohistochimique de PAR et PARP pour une série de tumeurs de CBNPC incluses en paraffine de patients ayant des tumeurs de stade I et ayant subi comme seul traitement une chirurgie permettant ainsi une analyse des marqueurs en baseline. Nous avons pu distinguer selon la médiane des marquages une population de tumeurs PAR<sup>low</sup> et PAR<sup>high</sup>, marqueurs que nous avons confrontés au devenir clinique des patients. Le statut PAR<sup>high</sup> des tumeurs était en analyse multivariée un marqueur de mauvais pronostic en terme de survie sans progression et de survie globale (**Figure 10**), résultat qui n'est pas retrouvé pour PARP. Ce résultat très intéressant nécessite cependant une validation sur d'autres séries de patients. Ces résultats confortent nos données *in vitro* ainsi que les données de la littérature, à savoir qu'il n'y a pas de corrélation entre l'expression et l'activité de PARP1, et que son activité PAR est en particulier plus pertinente comme biomarqueur.



**Figure 9. Analyse transcriptomique et métabolomique de la lignée A549 parentale et des clones CDDP-résistants en conditions baseline. A,B.** La lignée humaine A549 parentale (WT) de cancer bronchique non à petites cellules et ses clones résistants au CDDP (R4-R8) ont été soumises dans des conditions baseline à l'extraction des ARN en duplicats (a,b) (A) ou des métabolites en sextuplet (a-f) (B). Les données de gènes/métabolites normalisées sont réarrangées par classification ascendante hiérarchique en utilisant comme matrice de similarité la corrélation absolue de Pearson entre échantillons (12 et 18 en A et B, respectivement; lignes) et gènes/métabolites (1443 gènes et 126 métabolites putatifs significativement modulés en A et B; colonnes).



**Figure 10. La valeur pronostique de PAR chez les patients atteints de CBNPC. A,B.** Détection immunohistochemique de PAR et PARP dans des CBNPC de stade I. Images représentatives (barre d'échelle = 30 et 100 μm). **C.** Corrélation entre les taux de PAR et PARP, déterminés par des anticorps spécifiques en immunohistochemie pour 92 patients ayant un CBNPC de stade I. Notez que PARP est évaluable pour seulement 81 (des 92) patients. **D-G.** Courbes de survie selon Kaplan-Meier. La survie sans maladie (DFS) et la survie globale (OS), selon une stratification de la médiane de PAR (**D,E**) et de PARP (**F,G**). Sont rapportées les valeurs *p* (Logrank test), le nombre de patients stratifiés/nombre de rechutes + nombre de décès (pour DFS) ou le nombre de patients stratifiés/nombre de décès (pour OS).

## Références

(2011) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**: 609-615

Abkevich V, Timms KM, Hennessy BT, Potter J, Carey MS, Meyer LA, Smith-McCune K, Broaddus R, Lu KH, Chen J, Tran TV, Williams D, Iliev D, Jammulapati S, FitzGerald LM, Krivak T, DeLoia JA, Gutin A, Mills GB, Lanchbury JS (2012) Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* **107**: 1776-1782

Aly A, Ganesan S (2011) BRCA1, PARP, and 53BP1: conditional synthetic lethality and synthetic viability. *Journal of molecular cell biology* **3**: 66-74

Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, Scott C, Weitzel JN, Oaknin A, Loman N, Lu K, Schmutzler RK, Matulonis U, Wickens M, Tutt A (2010) Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* **376**: 245-251

Aurelius J, Thoren FB, Akhiani AA, Brune M, Palmqvist L, Hansson M, Hellstrand K, Martner A (2012) Monocytic AML cells inactivate antileukemic lymphocytes: role of NADPH oxidase/gp91(phox) expression and the PARP-1/PAR pathway of apoptosis. *Blood* **119**: 5832-5837

Ba X, Garg NJ (2011) Signaling mechanism of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in inflammatory diseases. *The American journal of pathology* **178**: 946-955

Bai P, Canto C (2012) The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease. *Cell metabolism* **16**: 290-295

Baker KM, Wei G, Schaffner AE, Ostrowski MC (2003) Ets-2 and components of mammalian SWI/SNF form a repressor complex that negatively regulates the BRCA1 promoter. *The Journal of biological chemistry* **278**: 17876-17884

Bedikian AY, Papadopoulos NE, Kim KB, Hwu WJ, Homsy J, Glass MR, Cain S, Rudewicz P, Vernillet L, Hwu P (2009) A phase IB trial of intravenous INO-1001 plus oral temozolomide in subjects with unresectable stage-III or IV melanoma. *Cancer investigation* **27**: 756-763

Berglund H, Pawitan Y, Kato S, Ishioka C, Soussi T (2008) Analysis of p53 mutation status in human cancer cell lines: a paradigm for cell line cross-contamination. *Cancer Biol Ther* **7**: 699-708

Birkbak NJ, Wang ZC, Kim JY, Eklund AC, Li Q, Tian R, Bowman-Colin C, Li Y, Greene-Colozzi A, Iglehart JD, Tung N, Ryan PD, Garber JE, Silver DP, Szallasi Z, Richardson AL (2012) Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents. *Cancer discovery* **2**: 366-375

Bouwman P, Aly A, Escandell JM, Pieterse M, Bartkova J, van der Gulden H, Hiddingh S, Thanasoula M, Kulkarni A, Yang Q, Haffty BG, Tommiska J, Blomqvist C, Drapkin R, Adams DJ, Nevanlinna H, Bartek J, Tarsounas M, Ganesan S, Jonkers J (2010) 53BP1 loss rescues

BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nature structural & molecular biology* **17**: 688-695

Brenner JC, Ateeq B, Li Y, Yocum AK, Cao Q, Asangani IA, Patel S, Wang X, Liang H, Yu J, Palanisamy N, Siddiqui J, Yan W, Cao X, Mehra R, Sabolch A, Basrur V, Lonigro RJ, Yang J, Tomlins SA, Maher CA, Elenitoba-Johnson KS, Hussain M, Navone NM, Pienta KJ, Varambally S, Feng FY, Chinnaiyan AM (2011) Mechanistic rationale for inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in ETS gene fusion-positive prostate cancer. *Cancer cell* **19**: 664-678

Brenner JC, Chinnaiyan AM (2009) Translocations in epithelial cancers. *Biochim Biophys Acta* **1796**: 201-215

Bryant HE, Helleday T (2006) Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activates ATM which is required for subsequent homologous recombination repair. *Nucleic acids research* **34**: 1685-1691

Bryant HE, Petermann E, Schultz N, Jemth AS, Loseva O, Issaeva N, Johansson F, Fernandez S, McGlynn P, Helleday T (2009) PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *The EMBO journal* **28**: 2601-2615

Bunting SF, Callen E, Wong N, Chen HT, Polato F, Gunn A, Bothmer A, Feldhahn N, Fernandez-Capetillo O, Cao L, Xu X, Deng CX, Finkel T, Nussenzweig M, Stark JM, Nussenzweig A (2010) 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* **141**: 243-254

Busch AM, Johnson KC, Stan RV, Sanglikar A, Ahmed Y, Dmitrovsky E, Freemantle SJ (2013) Evidence for tankyrases as antineoplastic targets in lung cancer. *BMC cancer* **13**: 211

Campalans A, Kortulewski T, Amouroux R, Menoni H, Vermeulen W, Radicella JP (2013) Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair. *Nucleic acids research* **41**: 3115-3129

Carbone M, Rossi MN, Cavaldesi M, Notari A, Amati P, Maione R (2008) Poly(ADP-ribose)ylation is implicated in the G0-G1 transition of resting cells. *Oncogene* **27**: 6083-6092

Cavallo F, Graziani G, Antinozzi C, Feldman DR, Houldsworth J, Bosl GJ, Chaganti RS, Moynahan ME, Jasin M, Barchi M (2012) Reduced proficiency in homologous recombination underlies the high sensitivity of embryonal carcinoma testicular germ cell tumors to Cisplatin and poly (adp-ribose) polymerase inhibition. *PloS one* **7**: e51563

Cazales M, Schmitt E, Montembault E, Dozier C, Prigent C, Ducommun B (2005) CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle* **4**: 1233-1238

Choudhury A, Zhao H, Jalali F, Al Rashid S, Ran J, Supiot S, Kiltie AE, Bristow RG (2009) Targeting homologous recombination using imatinib results in enhanced tumor cell chemosensitivity and radiosensitivity. *Mol Cancer Ther* **8**: 203-213

Couto CA, Wang HY, Green JC, Kiely R, Siddaway R, Borer C, Pears CJ, Lakin ND (2011) PARP regulates nonhomologous end joining through retention of Ku at double-strand breaks. *J Cell Biol* **194**: 367-375

Curtin NJ (2012) DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature reviews Cancer* **12**: 801-817

Daniel RA, Rozanska AL, Thomas HD, Mulligan EA, Drew Y, Castelbuono DJ, Hostomsky Z, Plummer ER, Boddy AV, Tweddle DA, Curtin NJ, Clifford SC (2009) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 enhances temozolomide and topotecan activity against childhood neuroblastoma. *Clin Cancer Res* **15**: 1241-1249

Dantzer F, Schreiber V, Niedergang C, Trucco C, Flatter E, De La Rubia G, Oliver J, Rolli V, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (1999) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair. *Biochimie* **81**: 69-75

De Vos M, Schreiber V, 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

Dean E, Middleton MR, Pwint T, Swaisland H, Carmichael J, Goodege-Kunwar P, Ranson M (2012) Phase I study to assess the safety and tolerability of olaparib in combination with bevacizumab in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* **106**: 468-474

Delaney CA, Wang LZ, Kyle S, White AW, Calvert AH, Curtin NJ, Durkacz BW, Hostomsky Z, Newell DR (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. *Clin Cancer Res* **6**: 2860-2867

Dobzhansky T (1946) Genetics of natural populations; recombination and variability in populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **31**: 269-290

Drew Y, Mulligan EA, Vong WT, Thomas HD, Kahn S, Kyle S, Mukhopadhyay A, Los G, Hostomsky Z, Plummer ER, Edmondson RJ, Curtin NJ (2011) Therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor AG014699 in human cancers with mutated or methylated BRCA1 or BRCA2. *J Natl Cancer Inst* **103**: 334-346

Dungey FA, Caldecott KW, Chalmers AJ (2009) Enhanced radiosensitization of human glioma cells by combining inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase with inhibition of heat shock protein 90. *Mol Cancer Ther* **8**: 2243-2254

Dungey FA, Loser DA, Chalmers AJ (2008) Replication-dependent radiosensitization of human glioma cells by inhibition of poly(ADP-Ribose) polymerase: mechanisms and therapeutic potential. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **72**: 1188-1197

Edwards SL, Brough R, Lord CJ, Natrajan R, Vatcheva R, Levine DA, Boyd J, Reis-Filho JS, Ashworth A (2008) Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature* **451**: 1111-1115

Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**: 917-921

Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, Mortimer P, Swaisland H, Lau A, O'Connor MJ, Ashworth A, Carmichael J, Kaye SB, Schellens JH, de Bono JS (2009) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *The New England journal of medicine* **361**: 123-134

Fong PC, Yap TA, Boss DS, Carden CP, Mergui-Roelvink M, Gourley C, De Greve J, Lubinski J, Shanley S, Messiou C, A'Hern R, Tutt A, Ashworth A, Stone J, Carmichael J, Schellens JH, de Bono JS, Kaye SB (2010) Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol* **28**: 2512-2519

Fraser M, Harding SM, Zhao H, Coackley C, Durocher D, Bristow RG (2011) MRE11 promotes AKT phosphorylation in direct response to DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* **10**: 2218-2232

Fraser M, Zhao H, Luoto KR, Lundin C, Coackley C, Chan N, Joshua AM, Bismar TA, Evans A, Helleday T, Bristow RG (2012) PTEN deletion in prostate cancer cells does not associate with loss of RAD51 function: implications for radiotherapy and chemotherapy. *Clin Cancer Res* **18**: 1015-1027

Gambi N, Tramontano F, Quesada P (2008) Poly(ADPR)polymerase inhibition and apoptosis induction in cDDP-treated human carcinoma cell lines. *Biochemical pharmacology* **75**: 2356-2363

Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K, Hirte H, Huntsman D, Clemons M, Gilks B, Yerushalmi R, Macpherson E, Carmichael J, Oza A (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

Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, Chen H, Litton JK, Potter J, Lanchbury JS, Stemke-Hale K, Hennessy BT, Arun BK, Hortobagyi GN, Do KA, Mills GB, Meric-Bernstam F (2011) Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* **17**: 1082-1089

Gottipati P, Vischioni B, Schultz N, Solomons J, Bryant HE, Djureinovic T, Issaeva N, Sleeth K, Sharma RA, Helleday T (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase is hyperactivated in homologous recombination-defective cells. *Cancer research* **70**: 5389-5398

Graeser M, McCarthy A, Lord CJ, Savage K, Hills M, Salter J, Orr N, Parton M, Smith IE, Reis-Filho JS, Dowsett M, Ashworth A, Turner NC (2010) A marker of homologous recombination predicts pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* **16**: 6159-6168



Ha HC, Snyder SH (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 13978-13982

Haince JF, McDonald D, Rodrigue A, Dery U, Masson JY, Hendzel MJ, Poirier GG (2008) PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *The Journal of biological chemistry* **283**: 1197-1208

Harbron C (2010) A flexible unified approach to the analysis of pre-clinical combination studies. *Statistics in medicine* **29**: 1746-1756

Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO (2006) Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **70**: 789-829

Helleday T (2011) The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Molecular oncology* **5**: 387-393

Horton JK, Watson M, Stefanick DF, Shaughnessy DT, Taylor JA, Wilson SH (2008) XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. *Cell research* **18**: 48-63

Horton TM, Jenkins G, Pati D, Zhang L, Dolan ME, Ribes-Zamora A, Bertuch AA, Blaney SM, Delaney SL, Hegde M, Berg SL (2009) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 potentiates the cytotoxic activity of temozolomide in leukemia cells: influence of mismatch repair status and O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity. *Mol Cancer Ther* **8**: 2232-2242

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

Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J (2012) Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 225-238

Huang Q, Shen HM (2009) To die or to live: the dual role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in autophagy and necrosis under oxidative stress and DNA damage. *Autophagy* **5**: 273-276

Huang Q, Wu YT, Tan HL, Ong CN, Shen HM (2009) A novel function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in modulation of autophagy and necrosis under oxidative stress. *Cell Death Differ* **16**: 264-277

Huang SH, Xiong M, Chen XP, Xiao ZY, Zhao YF, Huang ZY (2008) PJ34, an inhibitor of PARP-1, suppresses cell growth and enhances the suppressive effects of cisplatin in liver cancer cells. *Oncol Rep* **20**: 567-572

Ibrahim YH, Garcia-Garcia C, Serra V, He L, Torres-Lockhart K, Prat A, Anton P, Cozar P, Guzman M, Grueso J, Rodriguez O, Calvo MT, Aura C, Diez O, Rubio IT, Perez J, Rodon J, Cortes J, Ellisen LW, Scaltriti M, Baselga J (2012) PI3K inhibition impairs BRCA1/2 expression

and sensitizes BRCA-proficient triple-negative breast cancer to PARP inhibition. *Cancer discovery* **2**: 1036-1047

Jacob DA, Bahra M, Langrehr JM, Boas-Knoop S, Stefaniak R, Davis J, Schumacher G, Lippert S, Neumann UP (2007) Combination therapy of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor 3-aminobenzamide and gemcitabine shows strong antitumor activity in pancreatic cancer cells. *Journal of gastroenterology and hepatology* **22**: 738-748

Jankevicius G, Hassler M, Golia B, Rybin V, Zacharias M, Timinszky G, Ladurner AG (2013) A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation. *Nature structural & molecular biology*

Johnson N, Li YC, Walton ZE, Cheng KA, Li D, Rodig SJ, Moreau LA, Unitt C, Bronson RT, Thomas HD, Newell DR, D'Andrea AD, Curtin NJ, Wong KK, Shapiro GI (2011) Compromised CDK1 activity sensitizes BRCA-proficient cancers to PARP inhibition. *Nat Med* **17**: 875-882

Juvekar A, Burga LN, Hu H, Lunsford EP, Ibrahim YH, Balmana J, Rajendran A, Papa A, Spencer K, Lyssiotis CA, Nardella C, Pandolfi PP, Baselga J, Scully R, Asara JM, Cantley LC, Wulf GM (2012) Combining a PI3K inhibitor with a PARP inhibitor provides an effective therapy for BRCA1-related breast cancer. *Cancer discovery* **2**: 1048-1063

Kashiwaya K, Hosokawa M, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Shinomura Y, Nakamura Y, Nakagawa H (2009) Identification of C2orf18, termed ANT2BP (ANT2-binding protein), as one of the key molecules involved in pancreatic carcinogenesis. *Cancer science* **100**: 457-464

Kaye SB, Lubinski J, Matulonis U, Ang JE, Gourley C, Karlan BY, Amnon A, Bell-McGuinn KM, Chen LM, Friedlander M, Safra T, Vergote I, Wickens M, Lowe ES, Carmichael J, Kaufman B (2012) Phase II, open-label, randomized, multicenter study comparing the efficacy and safety of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, and pegylated liposomal doxorubicin in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol* **30**: 372-379

Khan OA, Gore M, Lorigan P, Stone J, Greystoke A, Burke W, Carmichael J, Watson AJ, McGown G, Thorncroft M, Margison GP, Califano R, Larkin J, Wellman S, Middleton MR (2011) A phase I study of the safety and tolerability of olaparib (AZD2281, KU0059436) and dacarbazine in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* **104**: 750-755

King BS, Cooper KL, Liu KJ, Hudson LG (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

Kraus WL, Lis JT (2003) PARP goes transcription. *Cell* **113**: 677-683

Krishnakumar R, Kraus WL (2010) The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell* **39**: 8-24

Kummar S, Chen A, Ji J, Zhang Y, Reid JM, Ames M, Jia L, Weil M, Speranza G, Murgu AJ, Kinders R, Wang L, Parchment RE, Carter J, Stotler H, Rubinstein L, Hollingshead M, Melillo G, Pommier Y, Bonner W, Tomaszewski JE, Doroshow JH (2011) Phase I study of PARP

inhibitor ABT-888 in combination with topotecan in adults with refractory solid tumors and lymphomas. *Cancer research* **71**: 5626-5634

Kummar S, Ji J, Morgan R, Lenz HJ, Puhalla SL, Belani CP, Gandara DR, Allen D, Kiesel B, Beumer JH, Newman EM, Rubinstein L, Chen A, Zhang Y, Wang L, Kinders RJ, Parchment RE, Tomaszewski JE, Doroshow JH (2012) A phase I study of veliparib in combination with metronomic cyclophosphamide in adults with refractory solid tumors and lymphomas. *Clin Cancer Res* **18**: 1726-1734

Kurman RJ, Shih Ie M (2011) Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Human pathology* **42**: 918-931

Langelier MF, Planck JL, Roy S, Pascal JM (2012) Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1. *Science* **336**: 728-732

Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, Scott C, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T, Matei D, Macpherson E, Watkins C, Carmichael J, Matulonis U (2012) Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *The New England journal of medicine* **366**: 1382-1392

Li L, Wang H, Yang ES, Arteaga CL, Xia F (2008) Erlotinib attenuates homologous recombinational repair of chromosomal breaks in human breast cancer cells. *Cancer research* **68**: 9141-9146

Liu LF, Desai SD, Li TK, Mao Y, Sun M, Sim SP (2000) Mechanism of action of camptothecin. *Annals of the New York Academy of Sciences* **922**: 1-10

Luo X, Kraus WL (2012) On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev* **26**: 417-432

Maeta Y, Shiota G, Okano J, Murawaki Y (2005) Effect of promoter methylation of the p16 gene on phosphorylation of retinoblastoma gene product and growth of hepatocellular carcinoma cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **26**: 300-305

Magan N, Isaacs RJ, Stowell KM (2012) Treatment with the PARP-inhibitor PJ34 causes enhanced doxorubicin-mediated cell death in HeLa cells. *Anti-cancer drugs* **23**: 627-637

Martello R, Mangerich A, Sass S, Dedon PC, Burkle A (2013) Quantification of cellular poly(ADP-ribosylation) by stable isotope dilution mass spectrometry reveals tissue- and drug-dependent stress response dynamics. *ACS chemical biology*

Michels J, Vitale I, Galluzzi L, Adam J, Olausson KA, Kepp O, Senovilla L, Talhaoui I, Guegan J, Enot DP, Talbot M, Robin A, Girard P, Orear C, Lissa D, Sukkurwala AQ, Garcia P, Behnam-Motlagh P, Kohno K, Wu GS, Brenner C, Dessen P, Saparbaev M, Soria JC, Castedo M, Kroemer G (2013a) Cisplatin Resistance Associated with PARP Hyperactivation. *Cancer research* **73**: 2271-2280

- Michels J, Vitale I, Senovilla L, Enot DP, Garcia P, Lissa D, Olaussen KA, Brenner C, Soria JC, Castedo M, Kroemer G (2013b) Synergistic interaction between cisplatin and PARP inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cell Cycle* **12**: 877-883
- Montoni A, Robu M, Pouliot E, Shah GM (2013) Resistance to PARP-Inhibitors in Cancer Therapy. *Frontiers in pharmacology* **4**: 18
- Moroni F, Cozzi A, Chiarugi A, Formentini L, Camaioni E, Pellegrini-Giampietro DE, Chen Y, Liang S, Zaleska MM, Gonzales C, Wood A, Pellicciari R (2012) Long-lasting neuroprotection and neurological improvement in stroke models with new, potent and brain permeable inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *British journal of pharmacology* **165**: 1487-1500
- Mukhopadhyay A, Elattar A, Cerbinskaite A, Wilkinson SJ, Drew Y, Kyle S, Los G, Hostomsky Z, Edmondson RJ, Curtin NJ (2010) Development of a functional assay for homologous recombination status in primary cultures of epithelial ovarian tumor and correlation with sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Clin Cancer Res* **16**: 2344-2351
- Munoz-Gamez JA, Quiles-Perez R, Ruiz-Extremuera A, Martin-Alvarez AB, Sanjuan-Nunez L, Carazo A, Leon J, Oliver FJ, Salmeron J (2011) Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase-1 enhances doxorubicin activity against liver cancer cells. *Cancer letters* **301**: 47-56
- Niere M, Mashimo M, Agledal L, Dolle C, Kasamatsu A, Kato J, Moss J, Ziegler M (2012) ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3), not poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) isoforms, is responsible for degradation of mitochondrial matrix-associated poly(ADP-ribose). *The Journal of biological chemistry* **287**: 16088-16102
- Noguchi M, Yu D, Hirayama R, Ninomiya Y, Sekine E, Kubota N, Ando K, Okayasu R (2006) Inhibition of homologous recombination repair in irradiated tumor cells pretreated with Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Biochem Biophys Res Commun* **351**: 658-663
- Noren Hooten N, Kompaniez K, Barnes J, Lohani A, Evans MK (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1). *The Journal of biological chemistry* **286**: 44679-44690
- Nowsheen S, Bonner JA, Lobuglio AF, Trummell H, Whitley AC, Dobelbower MC, Yang ES (2011) Cetuximab augments cytotoxicity with poly (adp-ribose) polymerase inhibition in head and neck cancer. *PloS one* **6**: e24148
- O'Connor KW, Dejsuphong D, Park E, Nicolae CM, Kimmelman AC, D'Andrea AD, Moldovan GL (2013) PARI Overexpression Promotes Genomic Instability and Pancreatic Tumorigenesis. *Cancer research* **73**: 2529-2539
- Pacher P, Szabo C (2007) Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovascular drug reviews* **25**: 235-260
- Pal SK, Childs BH, Pegram M (2011) Triple negative breast cancer: unmet medical needs. *Breast cancer research and treatment* **125**: 627-636

Palma JP, Wang YC, Rodriguez LE, Montgomery D, Ellis PA, Bukofzer G, Niquette A, Liu X, Shi Y, Lasko L, Zhu GD, Penning TD, Giranda VL, Rosenberg SH, Frost DJ, Donawho CK (2009) ABT-888 confers broad in vivo activity in combination with temozolomide in diverse tumors. *Clin Cancer Res* **15**: 7277-7290

Park SY, Cheng YC (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 could facilitate the religation of topoisomerase I-linked DNA inhibited by camptothecin. *Cancer research* **65**: 3894-3902

Patel AG, De Lorenzo SB, Flatten KS, Poirier GG, Kaufmann SH (2012) Failure of iniparib to inhibit poly(ADP-Ribose) polymerase in vitro. *Clin Cancer Res* **18**: 1655-1662

Patel AG, Sarkaria JN, Kaufmann SH (2011) Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 3406-3411

Piao L, Nakagawa H, Ueda K, Chung S, Kashiwaya K, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Daigo Y, Matsuda K, Nakamura Y (2011) C12orf48, termed PARP-1 binding protein, enhances poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activity and protects pancreatic cancer cells from DNA damage. *Genes, chromosomes & cancer* **50**: 13-24

Pines A, Mullenders LH, van Attikum H, Luijsterburg MS (2013) Touching base with PARPs: moonlighting in the repair of UV lesions and double-strand breaks. *Trends in biochemical sciences*

Pines A, Vrouwe MG, Marteiijn JA, Typas D, Luijsterburg MS, Cansoy M, Hensbergen P, Deelder A, de Groot A, Matsumoto S, Sugawara K, Thoma N, Vermeulen W, Vrieling H, Mullenders L (2012) PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J Cell Biol* **199**: 235-249

Plummer R, Jones C, Middleton M, Wilson R, Evans J, Olsen A, Curtin N, Boddy A, McHugh P, Newell D, Harris A, Johnson P, Steinfeldt H, Dewji R, Wang D, Robson L, Calvert H (2008) Phase I study of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **14**: 7917-7923

Plummer R, Lorigan P, Steven N, Scott L, Middleton MR, Wilson RH, Mulligan E, Curtin N, Wang D, Dewji R, Abbattista A, Gallo J, Calvert H (2013) A phase II study of the potent PARP inhibitor, Rucaparib (PF-01367338, AG014699), with temozolomide in patients with metastatic melanoma demonstrating evidence of chemopotential. *Cancer chemotherapy and pharmacology*

Rajan A, Carter CA, Kelly RJ, Gutierrez M, Kummar S, Szabo E, Yancey MA, Ji J, Mannargudi B, Woo S, Spencer S, Figg WD, Giaccone G (2012) A phase I combination study of olaparib with cisplatin and gemcitabine in adults with solid tumors. *Clin Cancer Res* **18**: 2344-2351

Riffell JL, Lord CJ, Ashworth A (2012) Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. *Nat Rev Drug Discov* **11**: 923-936

Robu M, Shah RG, Petitclerc N, Brind'Amour J, Kandan-Kulangara F, Shah GM (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

Rosado MM, Bennici E, Novelli F, Pioli C (2013) Beyond DNA repair, the immunological role of PARP-1 and its siblings. *Immunology* **139**: 428-437

Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG (2010) PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature reviews Cancer* **10**: 293-301

Russo AL, Kwon HC, Burgan WE, Carter D, Beam K, Weizheng X, Zhang J, Slusher BS, Chakravarti A, Tofilon PJ, Camphausen K (2009) In vitro and in vivo radiosensitization of glioblastoma cells by the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor E7016. *Clin Cancer Res* **15**: 607-612

Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, Agarwal MK, Higgins J, Friedman C, Villegas E, Jacquemont C, Farrugia DJ, Couch FJ, Urban N, Taniguchi T (2008) Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* **451**: 1116-1120

Sakata K, Someya M, Matsumoto Y, Tauchi H, Kai M, Toyota M, Takagi M, Hareyama M, Fukushima M (2011) Gimeracil, an inhibitor of dihydropyrimidine dehydrogenase, inhibits the early step in homologous recombination. *Cancer science* **102**: 1712-1716

Samol J, Ranson M, Scott E, Macpherson E, Carmichael J, Thomas A, Cassidy J (2012) Safety and tolerability of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, olaparib (AZD2281) in combination with topotecan for the treatment of patients with advanced solid tumors: a phase I study. *Investigational new drugs* **30**: 1493-1500

Schaffner C, Idler I, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P (2000) Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 2773-2778

Schultz N, Lopez E, Saleh-Gohari N, Helleday T (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic acids research* **31**: 4959-4964

Seki A, Coppinger JA, Jang CY, Yates JR, Fang G (2008) Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* **320**: 1655-1658

Senra JM, Telfer BA, Cherry KE, McCrudden CM, Hirst DG, O'Connor MJ, Wedge SR, Stratford IJ (2011) Inhibition of PARP-1 by olaparib (AZD2281) increases the radiosensitivity of a lung tumor xenograft. *Mol Cancer Ther* **10**: 1949-1958

Shackelford DB, Shaw RJ (2009) The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature reviews Cancer* **9**: 563-575

Shall S, de Murcia G (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutation research* **460**: 1-15

Sharrocks AD (2001) The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 827-837

Sourisseau T, Maniotis D, McCarthy A, Tang C, Lord CJ, Ashworth A, Linardopoulos S (2010) Aurora-A expressing tumour cells are deficient for homology-directed DNA double strand-break repair and sensitive to PARP inhibition. *EMBO molecular medicine* **2**: 130-142

Spagnolo L, Barbeau J, Curtin NJ, Morris EP, Pearl LH (2012) Visualization of a DNA-PK/PARP1 complex. *Nucleic acids research* **40**: 4168-4177

Stefansson OA, Jonasson JG, Johannsson OT, Olafsdottir K, Steinarsdottir M, Valgeirsdottir S, Eyfjord JE (2009) Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes. *Breast cancer research : BCR* **11**: R47

Strom CE, Johansson F, Uhlen M, Szigyarto CA, Erixon K, Helleday T (2011) Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. *Nucleic acids research* **39**: 3166-3175

Strosznajder RP, Czubowicz K, Jesko H, Strosznajder JB (2010) Poly(ADP-ribose) metabolism in brain and its role in ischemia pathology. *Molecular neurobiology* **41**: 187-196

Szabo C (2005) Roles of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* **52**: 60-71

Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, Muzi A, Vergati M, Forini O, Lacal PM, Ruffini F, Gold B, Li W, Zhang J, Graziani G (2005) Poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor as chemosensitizer of malignant melanoma for temozolomide. *Eur J Cancer* **41**: 2948-2957

Tentori L, Muzi A, Dorio AS, Scarsella M, Leonetti C, Shah GM, Xu W, Camaioni E, Gold B, Pellicciari R, Dantzer F, Zhang J, Graziani G (2010) Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activity in PARP-1 silenced tumour cells increases chemosensitivity to temozolomide and to a N3-adenine selective methylating agent. *Current cancer drug targets* **10**: 368-383

Tentori L, Turriziani M, Franco D, Serafino A, Levati L, Roy R, Bonmassar E, Graziani G (1999) Treatment with temozolomide and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors induces early apoptosis and increases base excision repair gene transcripts in leukemic cells resistant to triazene compounds. *Leukemia* **13**: 901-909

Thomas HD, Calabrese CR, Batey MA, Canan S, Hostomsky Z, Kyle S, Maegley KA, Newell DR, Skalitzky D, Wang LZ, Webber SE, Curtin NJ (2007) Preclinical selection of a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor for clinical trial. *Mol Cancer Ther* **6**: 945-956

Toller IM, Altmeyer M, Kohler E, Hottiger MO, Muller A (2010) Inhibition of ADP ribosylation prevents and cures helicobacter-induced gastric preneoplasia. *Cancer research* **70**: 5912-5922

Tsutsumi M, Masutani M, Nozaki T, Kusuoka O, Tsujiuchi T, Nakagama H, Suzuki H, Konishi Y, Sugimura T (2001) Increased susceptibility of poly(ADP-ribose) polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity. *Carcinogenesis* **22**: 1-3

Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, Friedlander M, Arun B, Loman N, Schmutzler RK, Wardley A, Mitchell G, Earl H, Wickens M, Carmichael J (2010)

Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* **376**: 235-244

Vodenicharov MD, Ghodgaonkar MM, Halappanavar SS, Shah RG, Shah GM (2005) Mechanism of early biphasic activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in response to ultraviolet B radiation. *Journal of cell science* **118**: 589-599

Wang JC (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 430-440

Wang Y, Kim NS, Haince JF, Kang HC, David KK, Andrabi SA, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM (2011) Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Science signaling* **4**: ra20

Weston VJ, Oldreive CE, Skowronska A, Oscier DG, Pratt G, Dyer MJ, Smith G, Powell JE, Rudzki Z, Kearns P, Moss PA, Taylor AM, Stankovic T (2010) The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo. *Blood* **116**: 4578-4587

Williamson CT, Muzik H, Turhan AG, Zamo A, O'Connor MJ, Bebb DG, Lees-Miller SP (2010) ATM deficiency sensitizes mantle cell lymphoma cells to poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors. *Mol Cancer Ther* **9**: 347-357

Yang G, Chang B, Yang F, Guo X, Cai KQ, Xiao XS, Wang H, Sen S, Hung MC, Mills GB, Chang S, Multani AS, Mercado-Urbe I, Liu J (2010) Aurora kinase A promotes ovarian tumorigenesis through dysregulation of the cell cycle and suppression of BRCA2. *Clin Cancer Res* **16**: 3171-3181

Yang YG, Cortes U, Patnaik S, Jasin M, Wang ZQ (2004) Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks. *Oncogene* **23**: 3872-3882

Ying S, Hamdy FC, Helleday T (2012) Mre11-dependent degradation of stalled DNA replication forks is prevented by BRCA2 and PARP1. *Cancer research* **72**: 2814-2821

Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2006) Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 18314-18319

Zaremba T, Ketzer P, Cole M, Coulthard S, Plummer ER, Curtin NJ (2009) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 polymorphisms, expression and activity in selected human tumour cell lines. *Br J Cancer* **101**: 256-262

Zhang JX, Li DQ, He AR, Motwani M, Vasiliou V, Eswaran J, Mishra L, Kumar R (2012) Synergistic inhibition of hepatocellular carcinoma growth by cotargeting chromatin modifying enzymes and poly (ADP-ribose) polymerases. *Hepatology* **55**: 1840-1851