

Université de Montréal

Étude des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de PARP dans le cancer de la prostate

Par

Maxime Cahuzac

Programme de biologie moléculaire, Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en biologie moléculaire, option maladies complexes chez l'humain

Avril 2022

© Maxime Cahuzac, 2022

Cette thèse intitulée

Étude des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de PARP dans le cancer de la prostate

Présentée par
Maxime Cahuzac

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Richard Bertrand
Président-rapporteur

Dre. Anne-Marie Mes-Masson
Directrice de recherche

Dr. Fred Saad
Codirecteur

Dr. Frédérick A Mallette
Membre du jury

Dr. Derrick Gibbings
Examineur externe

Dre. Geneviève Deblois
Représentante de la doyenne

Résumé

Le cancer de la prostate (CP) est le cancer le plus diagnostiqué chez les hommes en Amérique du Nord. Même si les méthodes de détection et les traitements s'améliorent au fil des années, le phénomène de résistance reste encore un problème majeur pour les thérapies utilisées de nos jours. En effet, une majorité des patients vont développer une résistance à l'hormonothérapie et seront alors traités avec une variété d'agents de type hormonal et avec de la chimiothérapie. Malheureusement, ces derniers, individuellement, rallongent la durée de vie des patients que de quelques mois seulement. De ce fait, de nouvelles thérapies, comme les inhibiteurs de PARP (PARPi ; olaparib, niraparib, talazoparib et rucaparib), sont à l'heure actuelle en essais cliniques. Ces composés ciblent la réparation de l'ADN dans le but d'induire une mort cellulaire lorsque des mutations au niveau de cette voie sont présentes. Il est bien connu dans le cancer de l'ovaire et du sein que plusieurs formes de résistances peuvent se mettre en place au cours du temps. Cette résistance aux PARPi dans le CP est encore trop peu étudiée et demeure incomprise. Ce projet de thèse s'est ainsi intéressé à la résistance innée mais aussi acquise à l'olaparib dans le CP. Nous avons démontré dans notre première étude que les cellules du CP sont plus résistantes à l'olaparib quand leur niveau basal d'autophagie est plus élevé. Cette résistance médiée par l'autophagie est due, en partie, par la régulation de la localisation nucléaire de la protéine *sequestrosome 1* (SQSTM1/p62), capable de dégrader la *filamine A* (FLNA), essentielle dans le recrutement de Rad51 lors de la recombinaison homologue (HR). Notre étude suggère donc une prise en compte de l'autophagie avant le traitement à l'olaparib pour y déterminer l'efficacité potentielle de ce PARPi. Dans notre deuxième étude, nous avons développé des lignées du CP résistantes à l'olaparib pour y déterminer les voies moléculaires les plus affectées par cette acquisition de résistance et pouvant réguler la résistance acquise. Nous avons mis en évidence que certaines voies, comme les mécanismes de réparation de l'ADN et l'autophagie, pouvaient jouer un rôle essentiel dans la mise en place de résistance acquise à l'olaparib. Cibler certains membres de ces voies comme BRCC3, ATG2B ou ROCK2, pourrait permettre d'inverser la résistance et ainsi permettre d'augmenter l'efficacité de l'olaparib sur le long terme. Ces travaux permettent ainsi de mieux caractériser le phénomène de résistance aux PARPi dans le CP en

donnant de nouvelles cibles pour anticiper son apparition et l'inverser. Ils ont aussi permis d'illustrer l'importance du mécanisme d'autophagie dans la réponse aux PARPi dans le CP.

Mots-clés : autophagie, cancer de la prostate, inhibiteurs de PARP, olaparib, réparation de l'ADN, recombinaison homologue, résistance.

Abstract

Prostate cancer (CP) is the most diagnosed cancer in North America. Even if detection and treatments have improved over the years, the phenomenon of resistance remains a major problem for the therapies used today. Indeed, most patients will develop resistance to hormone therapy and will subsequently be treated with a variety of hormonally-based agents and chemotherapeutic agents. Unfortunately, these agents extend survival by only a few months each. As a result, new therapies, such as PARP inhibitors (PARPi; olaparib, niraparib, talazoparib and rucaparib), are currently in clinical trials. These compounds target DNA repair with the aim of inducing cell death when mutations in this pathway are present. It is well known in ovarian and breast cancer that several forms of resistance will develop over time. Unfortunately, this resistance to PARPi in CP is not well studied and therefore understood. This thesis project focused on innate but also acquired resistance to olaparib in CP. We demonstrated in our first study that CP cells are more resistant to olaparib when their basal level of autophagy is higher. This resistance mediated by autophagy is due, in part, by the regulation of the nuclear localization of the protein sequestrosome 1 (SQSTM1/p62), which degrades filamin A (FLNA), essential in the recruitment of Rad51 during the homologous recombination (HR). Our study therefore suggests the importance of considering autophagy before olaparib treatment to predict the effectiveness of a PARPi. In our second study, we developed CP lines resistant to olaparib to determine the molecular pathways most affected by this acquired resistance and able to contribute to resistance. We have shown that different pathways, such as DNA repair mechanisms and autophagy, could play an essential role in the establishment of acquired resistance to olaparib. Targeting members of these pathways, such as BRCC3, ATG2B or ROCK2, may reverse resistance and thus increase the efficacy of olaparib. This work thus makes it possible to better characterize the phenomenon of resistance to PARPi in CP by identifying new targets to counter its appearance. Together these results support the importance of autophagy and DNA repair in the response to PARPi in PC.

Keywords: autophagy, prostate cancer, PARP inhibitors, olaparib, DNA repair, homologous recombination, resistance.

Liste des publications et contributions

Cahuzac M, Langlois P, Péant B, Fleury H, Mes-Masson A-M, Saad F. Pre-activation of autophagy impacts response to olaparib in prostate cancer cells. *Communications Biology*. 2022;5(1):251.

Communal L, Roy N, **Cahuzac M**, Rahimi K, Kobel M, Provencher DM, et al. A Keratin 7 and E-Cadherin Signature Is Highly Predictive of Tubo-Ovarian High-Grade Serous Carcinoma Prognosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(10).

Boudhraa Z, Zaoui K, Fleury H, **Cahuzac M**, Gilbert S, Tchakarska G, et al. NR1D1 regulation by Ran GTPase via miR4472 identifies an essential vulnerability linked to aneuploidy in ovarian cancer. *Oncogene*. 2022;41(3):309-20.

Bernard M, Cardin GB, **Cahuzac M**, Ayad T, Bissada E, Guertin L, et al. Dual Inhibition of Autophagy and PI3K/AKT/MTOR Pathway as a Therapeutic Strategy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9).

St-Georges-Robillard A, **Cahuzac M**, Peant B, Fleury H, Lateef MA, Ricard A, et al. Long-term fluorescence hyperspectral imaging of on-chip treated co-culture tumour spheroids to follow clonal evolution. *Integr Biol (Camb)*. 2019;11(4):130-41.

St-Georges-Robillard A, Masse M, **Cahuzac M**, Strupler M, Patra B, Orimoto AM, et al. Fluorescence hyperspectral imaging for live monitoring of multiple spheroids in microfluidic chips. *Analyst*. 2018;143(16):3829-40.

Manuscrit en préparation

Cahuzac M, Péant B, Mes-Masson A-M, Saad F. Development of olaparib-resistant prostate cancer cell lines to identify mechanisms associated with acquired resistance. En préparation pour *Cancers*.

Publications incluses dans cette thèse

Cahuzac M, Langlois P, Péant B, Fleury H, Mes-Masson A-M, Saad F. Pre-activation of autophagy impacts response to olaparib in prostate cancer cells. *Communications Biology*. 2022;5(1):251.

Incluse dans Chapitre 2 Article #1

Auteurs	Contributions
Maxime Cahuzac (Candidat)	Mise au point des expériences (80%)
	Analyse et interprétation des données (65%)
	Écriture du papier (55%)
Patricia Langlois	Mise au point des expériences (5%)
	Analyse et interprétation des données (5%)
	Écriture du papier (0%)
Benjamin Péant	Mise au point des expériences (10%)
	Analyse et interprétation des données (10%)
	Écriture du papier (20%)
Hubert Fleury	Mise au point des expériences (5%)
	Analyse et interprétation des données (5%)
	Écriture du papier (5%)
Anne-Marie Mes-Masson	Mise au point des expériences (0%)
	Analyse et interprétation des données (10%)
	Écriture du papier (10%)
Fred Saad	Mise au point des expériences (0%)
	Analyse et interprétation des données (5%)
	Écriture du papier (10%)

Cahuzac M, Péant B, Mes-Masson A-M, Saad F. Development of olaparib-resistant prostate cancer cell lines to identify mechanisms associated with acquired resistance. En préparation pour Cancers

Incluse dans Chapitre 2 Article #2

Auteurs	Contributions
Maxime Cahuzac (Candidat)	Mise au point des expériences (90%)
	Analyse et interprétation des données (70%)
	Écriture du papier (60%)
Benjamin Péant	Mise au point des expériences (10%)
	Analyse et interprétation des données (10%)
	Écriture du papier (20%)
Anne-Marie Mes-Masson	Mise au point des expériences (0%)
	Analyse et interprétation des données (10%)
	Écriture du papier (10%)
Fred Saad	Mise au point des expériences (0%)
	Analyse et interprétation des données (10%)
	Écriture du papier (10%)

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Liste des publications et contributions	vii
Table des matières	x
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations	xiv
Remerciements	xviii
Chapitre 1 – INTRODUCTION	1
1. Le cancer de la prostate	1
1.1.1. Anatomie et fonction de la prostate	1
1.1.2. Statistiques, incidence et facteurs de risques	2
1.1.3. Diagnostique.....	3
1.1.4. Traitements et progression	7
2. Mécanismes de réparation de l’ADN et cibles thérapeutiques	11
2.1.1. Les différents mécanismes de réparation de l’ADN	12
2.1.2. Les inhibiteurs de PARP	15
3. L’autophagie	21
3.1.1. Principe et caractéristiques	21
3.1.2. Acteur et cible thérapeutique dans le cancer.....	26
3.1.3. Autophagie et réparation de l’ADN	31
4. Projet de thèse	33
4.1.1. Problématique	33
4.1.2. Hypothèses de travail	34
4.1.3. Objectifs.....	34
Chapitre 2 – RÉSULTATS	36
1. Article #1 : Pre-activation of autophagy impacts olaparib sensitivity in prostate cancer cells...	36
1.1.1. Résumé en français	36
1.1.2. Version originale publiée dans Communications Biology.....	37
2. Article #2 : Development of olaparib-resistant prostate cancer cell lines to identify mechanisms associated with acquired resistance.	91

2.1.1. Résumé en français	91
2.1.2. Version originale en préparation pour Cancers.....	92
Chapitre 3 – DISCUSSION.....	120
1. L'autophagie dans la résistance innée à l'olaparib dans le cancer de la prostate.....	120
2. Les mécanismes de résistance acquise à l'olaparib dans le cancer de la prostate.....	126
Chapitre 4 – CONCLUSION.....	133
Références bibliographiques	135
Annexes.....	166

Liste des tableaux

Tableau 1. – Description du grade/score de Gleason.....	5
Tableau 2. – Système de classification TNM.....	6
Tableau 3. – Liste non exhaustive des mutations de gènes jouant dans la réparation de l’ADN chez des patients atteints d’un CP localisé ou avancé.....	15
Tableau 4. – Liste des inhibiteurs de PARP de troisième génération.	17
Tableau 5. – Liste de certains essais cliniques pour le CP résistant à la castration utilisant les PARPi.	20
Tableau 6. – Liste des modulateurs d’autophagie utilisés comme thérapie anti-cancéreuse...	30
Tableau 7. – Liste non exhaustive des études pré-cliniques ciblant l’autophagie en combinaison avec les PARPi.....	33

Liste des figures

Figure 1. – Anatomie de la prostate.	2
Figure 2. – Les stades du cancer de la prostate.	6
Figure 3. – Production de la testostérone et hormonothérapies principales.	9
Figure 4. – Ensemble des différents mécanismes de réparation de l’ADN.	12
Figure 5. – Principe de létalité synthétique.	19
Figure 6. – Principe d’autophagie canonique et non-canonique.	22
Figure 7. – Principe de formations des autolysosomes et recyclage lysosomal.	25
Figure 8. – Rôle de l’autophagie dans les mécanismes de réparation de l’ADN.	32
Figure 9. – Mécanismes de résistance innée et acquise à l’olaparib dans le CP.	132
Figure 10. – La pré-activation d’autophagie réduit les effets de l’olaparib sur l’activité SA-B-Gal et la morphologie cellulaire.	166
Figure 11. – Les DU145 n’expriment pas Atg5 et LC3-II.	167
Figure 12. – Induction de l’autophagie dans les lignées du cancer la prostate.	168

Liste des abréviations

53BP1	<i>tumor suppressor P53-binding protein</i>
ABCB4	cassette 4 se liant à l'ATP
ACHE	acétylcholinestérase
AGO2	<i>argonaute-2</i>
AL	autolysosome
AMBRA1	régulateur d'autophagie et de beclin-1
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
AP	site abasique
AP2	<i>adaptor protein 2</i>
APS	antigène spécifique de la prostate
ARE	éléments de réponses aux androgènes
ARL3	protéine 3 de type facteur de ribosylation ADP
ARR3	ADP-ribosylhydrolase 3
ATG	<i>autophagy-related genes</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
AV	autophagosome
Bad	agoniste associé à la protéine de mort cellulaire BCL2
Baf A1	bafilomycine A1
Bax	<i>Bcl-2-associated X</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BER	réparation par excision de base
BRCA1/2	<i>breast cancer 1/2</i>
BRCC3	sous-unité 3 du complexe BRCA1/2
CDK12	cycline-dépendante 12
CHEK2	checkpoint kinase 2
CLEAR	coordination d'expression et de régulation des lysosomes
CMA	autophagie médiée par les chaperonnes
CP	cancer de la prostate
CQ	chloroquine
CSB/CSA	<i>CS complementation group B et A</i>
DDB2	protéine de liaison de l'ADN endommagé 2
DEPTOR	protéine d'interaction mTOR contenant un domaine DEP
DFCP1	<i>double FYVE-containing protein 1</i>
DHT	5 α -dihydrotestostérone
DNM2	<i>GTPase dynamin 2</i>
DYNLL1	<i>dynein light chain LC8-type 1</i>
EPG5	<i>ectopic P-granules autophagy protein 5 homolog</i>
ER	réticulum endoplasmique
ERCC1	protéine de réparation de l'excision d'ADN
EZH2	<i>enhancer of zeste homolog 2</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

FIP200	protéine d'interaction de 200 kDa de la famille des kinases d'adhésion focales
FLNA	filamine A
GG	<i>global genome</i>
GRAMD4	<i>GRAM Domain Containing 4</i>
H2AX	histone H2A
HCQ	hydroxyCQ
HIP1 α	protéine hétérochromatine 1 alpha
HR	recombinaison homologue
IMPase	inositol monophosphatase
INPP5E	inositol Polyphosphate-5-Phosphatase E
KAP1	protéine-1 associée à KRAB
Keap1	<i>kelch like ECH associated protein 1</i>
KIF5B	membre 5 de la famille des kinésines
LH	lutéinostimuline
LHRH	hormone de libération de la lutéinostimuline
LPIN1	lipine 1
MCL1	protéine de différenciation des cellules de leucémie myéloïde
MDR	résistance multidrogue
miR	microARN
mLST8	complexe de la cible de la rapamycine sous-unité LST8
MMP2	métalloprotéinase 2
MMR	réparation par mésappariement
MSH2/6	protéines de réparation des mésappariements d'ADN 2 et 6
mTOR	protéine cible de la rapamycine chez les mammifères
NAD ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide
NDP52/CALCOCO2	<i>calcium binding and coiled-coil domain 2</i>
NER	réparation par excision de nucléotide
NF- κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NHEJ	jonction d'extrémités non-homologues
NRF2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
OGG1	8-oxoguanine glycosylase
OR	olaparib résistant
ORPL1	senseur au cholestérol
P-gp	P-glycoprotéine
p70-S6K	protéine ribosomale S6 kinase beta-1
PAR	chaînes de poly (ADP-ribose)
PARG	poly(ADP-ribose) glycohydrolase
PARPi	inhibiteur de PARP
PAS	phagophore
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PE	phosphatidyléthanolamine
PI(4,5)P2	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
PI3P	phosphatidylinositol-3-phosphate

PI4KII α	<i>membrane-bound phosphatidylinositol-4 kinase</i>
PI4P	phosphatidylinositol-4-phosphate
PIP5K1B	<i>phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type 1 beta</i>
PLEKHM1	<i>pleckstrin homology and run Domain containing M1</i>
PRAS40	substrat d'Akt de 40 kDa riche en proline
PTEN	<i>TENsin homolog</i>
PRKCD	protéine kinase C delta
PTIP	<i>PAX interacting protein 1</i>
PYCR1	<i>pyrroline-5-carboxylate reductase 1</i>
RA	récepteur aux androgènes
RAD6	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 2</i>
Rag	GTPases relatives à Ras
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
Raptor	protéine associée régulatrice de mTOR
RA-V7	variant d'épissage 7 du RA
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RLIP	protéine lysosomale d'interaction Rab
ROCK2	<i>Rho associated coiled-coil containing protein kinase2</i>
ROS	espèces réactives de l'oxygène
SA-B-Gal	SA-beta-galactosidase
SASP	<i>senescence-associated secretory phenotype</i>
SIRT3	sirtuine 3
SLC36A1	<i>lysosomal amino acid transporter-1</i>
SNAP29	protéine 29 associée aux synaptosomes
Spin	spinster
SQSTM1/p62	<i>sequestosome-1</i>
Stat3	signal transducteur et activateur de transcription 3
STX17	<i>syntaxine 17</i>
TC	transcription coupled
TEM	transition épithélio-mésenchymateuse
TFEB	facteur de transcription EB
TMPRSS2	<i>transmembrane protease serine 2</i>
TRAF6	récepteur associé au facteur TNF 6
TST	testostérone
TWIST1	<i>twist-related protein 1</i>
ULK1	<i>unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1</i>
USP45	ubiquitine spécifique peptidase 45
UVRAG	<i>UV radiation resistance associated</i>
VAMP8	protéine membranaire associée aux vésicules 8
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VPS34	phosphatidylinositol-3 kinase de classe III
WIPI	<i>WD repeat domain phosphoinositide-interacting</i>
WRN	<i>WRN RecQ Like Helicase</i>
WT	parental (<i>wild-type</i>)

XPA	<i>xeroderma pigmentosum type A</i>
XPB/D	<i>xeroderma pigmentosum type B et D</i>
XPC	<i>xeroderma pigmentosum, type C</i>
XPO1	exportine 1

Remerciements

Je tiens tout d'abord à grandement remercier mes deux superviseurs, Dre. Anne-Marie Mes-Masson et Dr. Fred Saad, qui m'ont donné l'opportunité de réaliser mon doctorat dans leur laboratoire. Sans votre expertise dans le domaine de la biologie moléculaire et dans celui du cancer de la prostate, je n'aurai pas réussi à avancer comme il se doit. Vous avez toujours été là pour que je puisse développer mon esprit critique sur mon projet de thèse et accroître mes connaissances sur celui-ci. Je suis extrêmement honoré d'avoir réalisé mon doctorat avec vous, merci! Je remercie bien évidemment tous les membres de ce jury de thèse, Dr. Richard Bertrand, Dr. Frédérick A Mallette, Dr. Derrick Gibbings et Dre. Geneviève Deblois pour le temps qu'ils ont consacré dans le suivi de mon projet mais aussi pour la correction de cette thèse.

Je tiens aussi à remercier les associés de recherche du laboratoire, Dr. Benjamin Péant, Dre. Euridice Carmona ainsi que Dre. Véronique Ouellet qui ont toujours été disponibles pour apporter leurs points de vue ainsi que leurs expertises sur ce projet de thèse. Vous avez été d'une très grande aide dans l'avancement de mon projet ainsi que dans les moments les plus difficiles. Bien évidemment je remercie aussi tous les membres actuels du laboratoire, Adriana, Alex, Chantale, Claudia, Dina, Geneviève, Jennifer, Kim, Liliane, Lise, Manon, Nathalie, Nicolas L, Véronique B, et Yaser ainsi que les anciens, Amine et Zied, pour toute leur aide lors de mon doctorat mais aussi pour tous les bons moments que nous avons passé tous ensemble. Un grand merci aussi à tous les petits (anciens) nouveaux qui se sont joints au laboratoire ces derniers mois, Charlie le parisien, Kev, Patricia, Su et Wenjing. Vous avez apporté une nouvelle dynamique au laboratoire rendant la fin de mon doctorat positive! Je remercie aussi tous les membres présents ou passés de l'Institut du cancer de Montréal avec qui j'ai énormément discuté de tout et de rien en particulier David P, MAO, Nico et Pam. Un gros merci aussi à Aurélie de la plateforme de microscopie pour son expertise dans le domaine et le temps passé à optimiser l'une de plus belles expériences de mon projet.

Un grand merci aussi à tous les anciens des bureaux étudiants du laboratoire qui sont partis relever de nouveaux défis et qui m'ont accueilli dès mon arrivée au laboratoire en 2017 et avec qui j'ai développé une excellente amitié au fil des années. Je parle bien évidemment

d'Hubert, Kayla, Laudine, Sophie et Sylvie. Ma vie de doctorant n'aurait pas été aussi sympa et stimulante sans vous tous, merci les amis! Nos moments escalades, randonnées, sorties extérieures, 5@7 mais aussi nos discussions scientifiques me manquent énormément. Je remercie bien évidemment mes amis en dehors du laboratoire, scientifiques ou non, qui sont David, Joana, Marine, Olivia, Pierre, Rémi et Teddy, pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble. Ces moments ont été très importants pour moi.

Pour finir je souhaite remercier mes parents et ma petite sœur qui ont toujours été là pour moi depuis le début de mon aventure canadienne en 2013. La distance n'a pas toujours été simple mais vous m'avez toujours soutenu et cru en moi qu'importe les difficultés que la vie nous impose. Enfin, un grand merci à ma conjointe Alexia qui m'a supporté et bien évidemment soutenu dans les dernières années de mon doctorat. Tu as toujours été là pour moi dans les moments les plus difficiles d'un doctorat mais aussi de la vie. Je suis vraiment heureux que nos chemins se soient croisés pendant nos cours de forro au CRCHUM.

Chapitre 1 – INTRODUCTION

1. Le cancer de la prostate

1.1.1. Anatomie et fonction de la prostate

La prostate est une petite glande de l'appareil urogénital de l'homme d'environ 3 cm de hauteur, 4 cm de largeur et de moins de 20 g (1, 2). Elle est située devant le rectum, en dessous de la vessie et est proche des vésicules séminales (Figure 1). Elle est essentielle dans la production de 30 à 35% du liquide séminal. Cette fraction que la prostate produit est riche en protéines et nutriments, tel que le zinc, importants dans l'alcalinisation du pH pour la survie et la stabilisation des spermatozoïdes dans l'appareil génital féminin. Parmi ces protéines, l'*antigène spécifique de la prostate* (APS) est l'une des plus importantes et est produite exclusivement par les cellules sécrétrices prostatiques. L'APS permet principalement de liquéfier le liquide séminal en clivant les séménogélines (3). Ces événements ne surviennent qu'à partir de la puberté, en réponse à la production de la *testostérone* (TST) par les testicules. À partir de 50 ans en moyenne, les cellules épithéliales prostatiques peuvent commencer à se diviser de façon incontrôlée entraînant la formation d'un *cancer de la prostate* (CP).

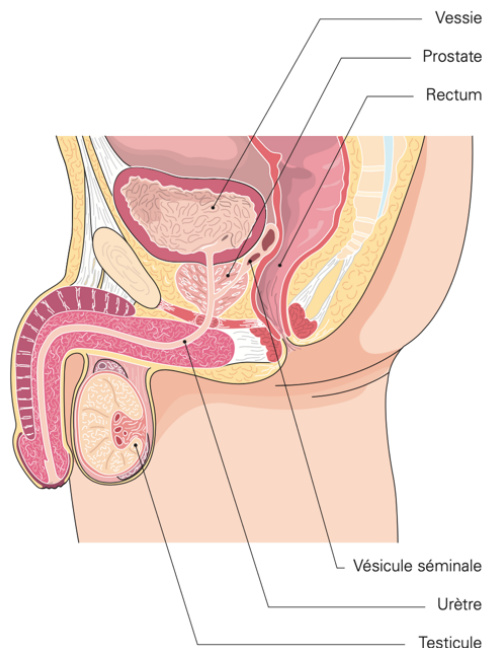


Figure 1. – Anatomie de la prostate.

Reproduite avec la permission de Dr. Saad (1)

1.1.2. Statistiques, incidence et facteurs de risques

1.1.2.1. Statistiques et incidence

Le CP est le cancer le plus commun chez les hommes en Amérique du Nord. Au Canada, un homme sur 7 recevra un diagnostic de CP dans sa vie. En 2020, environ 23 300 hommes ont reçu un diagnostic pour ce cancer (4, 5). Il représente environ 20% des cancers totaux diagnostiqués au Canada. Même si son incidence est élevée, le taux de survie après 5 ans est relativement haut dépendamment du stade du CP lors du diagnostic. Selon la Société Canadienne du cancer, il s'élèverait à environ 93% lorsque le cancer est à un stade bas et localisé et serait de 28% lorsqu'il s'est propagé (6). Le taux de mortalité ne cesse de diminuer depuis 1994 grâce au dépistage et aux nouveaux traitements mis en place depuis. Celui-ci s'est élevé à 4 200 décès en 2020 (6).

1.1.2.2. Facteurs de risques

Parmi les facteurs de risques l'âge, l'obésité et la génétique sont les plus importants. Le risque de développer un CP passe de 0,005% pour les hommes âgés de moins de 39 ans à 2,2% pour ceux entre 40 et 59 ans et à 13,7% pour ceux entre 60 et 70 ans (7). Certaines études suggèrent que l'alimentation et le surpoids peuvent aussi jouer un rôle important dans le développement du CP (8-12). En effet, il a été démontré qu'un régime alimentaire riche en calcium et en gras saturés pouvait augmenter les risques de développer un CP. Une déficience en certaines vitamines, dont la D, a aussi été associée à l'apparition de ce type de cancer (13). Finalement la génétique est aussi considérée comme un facteur de risque pour le CP. Les études ont mis en avant qu'une personne ayant un cas de CP dans sa famille la plus proche (frère ou père) a deux fois plus de risque de développer un CP que la population générale (14, 15). Cette prédisposition familiale représenterait environ 15% de cas de CP totaux (16, 17). Avec le développement, ces dernières années, des séquençages à haut débit, plusieurs gènes mutés

favorisant le CP ont été découverts. Parmi les plus connus, des gènes importants dans les mécanismes de réparation de l'ADN dont *Breast cancer 1/2* (BRCA1/2), *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) ou encore la *Checkpoint Kinase 2* (CHEK2), ont été identifiés, ainsi que d'autres gènes suppresseurs de tumeur ou pro-oncogéniques comme la *protéine tumorale 53* (p53), la *phosphatase and TENsin homolog* (PTEN) et MYC (18, 19).

1.1.3. Diagnostique

1.1.3.1. Dépistage

Mesure de l'APS et toucher rectal

Dans 80% des cas, le CP est découvert lors d'un contrôle de routine, en raison de ses caractéristiques asymptomatiques. De ce fait, la Société des urologues du Canada recommande de faire un test de mesure de l'APS pour tous les hommes ayant plus de 50 ans (20). En règle générale, un taux d'APS est considéré comme normal quand il est inférieur à 4 ng/mL. Ce test est complété par un toucher rectal qui permet de déterminer la présence ou non d'une masse au niveau de la face extérieure de la prostate. Si les résultats indiquent une valeur comprise entre 4 et 10 ng/mL ou de plus de 10 ng/mL avec aucune masse au toucher, le risque associé à un CP s'élève respectivement à 30% et 50% (1). Pour une valeur de plus de 10 ng/mL avec la présence d'une masse ce risque monte à 80%. De nouvelles mesures d'APS auront lieu tous les 4 ans pour les hommes avec un taux inférieur à 1 ng/mL ou tous les 2 ans pour un taux compris entre 1 et 3 ng/mL (20). Même si la mesure du taux de l'APS reste la méthode de dépistage la plus utilisée, elle peut amener à des faux positifs et des faux négatifs. Pour contrer cela, les urologues ont ajouté trois paramètres supplémentaires pour le test de l'APS : la cinétique, la densité de l'APS ainsi que le pourcentage de l'APS libre dans le sang (20, 21). La cinétique de l'APS consiste à prendre en compte le temps de doublement de l'APS au cours du temps. La densité consiste quant à elle à tenir compte de la taille de la glande prostatique en la divisant par le taux d'APS obtenu. Enfin, l'APS libre (non rattaché à d'autres protéines) permet de discriminer l'APS produit lors d'une hyperplasie bénigne de la prostate versus l'APS produit par les cellules cancéreuses de la prostate. Dans le cas où des valeurs anormales sont observées, une échographie transrectale ainsi que des biopsies sont réalisées.

Échographie transrectale et biopsies

L'échographie transrectale permet aux urologues d'obtenir une image de la glande prostatique à l'aide d'un appareil qui produit des ondes sonores et qui est introduit dans le rectum des patients. Cette méthode est peu invasive et peu douloureuse (1). Elle ne permet pas de déterminer la présence ou non d'un cancer, mais aide à déceler des zones à risque. En fonction des résultats, des biopsies peuvent être réalisées. Contrairement à l'échographie, les biopsies sont invasives. Une aiguille est introduite dans le rectum des patients et perce la paroi de celui-ci pour atteindre les zones à risque dans la prostate. Habituellement, une douzaine d'échantillons sont prélevés et envoyés en pathologie pour y déterminer la présence de cellules cancéreuses dans le tissu. Si le CP est confirmé, une évaluation de sa progression est réalisée grâce à la détermination de son stade et de son grade.

1.1.3.2. Classification du cancer de la prostate

La classification du CP se base sur deux critères principaux : le grade histologique ainsi que le stade clinique.

Le grade et score de Gleason

Le grade permet avant tout de déterminer l'agressivité du cancer présent en se basant sur la morphologie tissulaire des biopsies récoltées. Pour cela, une échelle de différenciation cellulaire allant de 1 à 5 a été mis en place par le Dr. Donald F. Gleason en 1966 et remis à jour aux cours des dernières années (22-24). Ainsi, un grade 1 détermine un tissu avec une architecture majoritairement normale, proche du tissu sain, et un grade 5, un tissu indifférencié et éloigné de la structure de base (Tableau 1) (25, 26). La prostate étant une glande très hétérogène, certaines zones des biopsies peuvent avoir une différenciation cellulaire beaucoup plus importante qu'une autre au sein d'une même biopsie. Le pathologiste va donc attribuer deux grades, le premier est majoritaire, environ 50%, et le deuxième minoritaire entre 5 et 50%. Ces grades sont ensuite additionnés pour donner un score de Gleason. Par exemple, un patient avec des grades 4+3 (score de 7) a un cancer plus avancé qu'un autre avec un score identique mais de grades de 3+4.

Tableau 1. – Description du grade/score de Gleason (25).

Groupe	Score	Grade	Description
1	≤ 6	Bas	Glandes prostatiques structurées majoritaires, cellules cancéreuses bien différenciées. Le cancer se développe lentement.
2	7 (3 + 4)	Intermédiaire bas	Glandes prostatiques structurées, cellules cancéreuses modérément différenciées. Le cancer peut se développer lentement.
3	7 (4 + 3)	Intermédiaire élevé	Glandes prostatiques structurées, cellules cancéreuses modérément différenciées. Le cancer se développe modérément.
4	8	Élevé	Glandes prostatiques non visibles, cellules cancéreuses peu différenciées. Le cancer se développe rapidement, risque de propagation
5	9 - 10	Très élevé	Glandes prostatiques non visibles, cellules cancéreuses indifférenciées. Le cancer se développe très rapidement, risque de propagation

Le stade

Le stade permet quant à lui de déterminer la propagation du cancer dans les organes avoisinants la prostate. Pour déterminer celui-ci, les cliniciens utilisent le système international TNM (T = *Tumor*, N = *Node*, M = *Metastasis*) créé en 1946 par Pierre Denoix (27). Ce dernier se base sur la taille de la tumeur dans la prostate (T), sur le degré d'atteinte des ganglions lymphatiques (N) et sur la présence ou non de métastases (M) (Tableau 2). Le facteur T clinique (cT) se divise en quatre niveaux différents : T1, le cancer n'est pas palpable au toucher rectal; T2, le cancer est détectable lors du toucher rectale et semble limité à l'intérieur de la capsule prostatique; T3, le cancer a franchi la capsule prostatique; et T4, le cancer a atteint d'autres organes avoisinants tels que le rectum ou la vessie (Figure 2) (1).

L'ensemble de toutes ces informations permettra au clinicien de déterminer les stratégies thérapeutiques à proposer aux patients.

Tableau 2. – Système de classification TNM (1).

TNM	Description
T	
T0	Aucune indication d'une tumeur dans la prostate
T1	Prostate normale, tumeur découverte à la suite du test d'APS
T2	Tumeur palpable et confinée dans la prostate
T3	La tumeur déborde de la prostate
T4	La tumeur a atteint les tissus voisins
N	
N0	Pas de trace de tumeur dans les ganglions
N+	Un ou plusieurs ganglions sont atteints
M	
M0	Aucune métastase au-delà des ganglions
M1	Présence de métastases dans les os ou autres sites

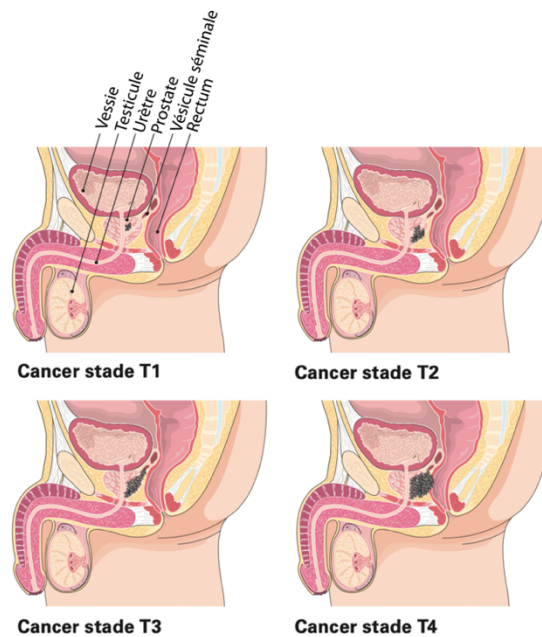


Figure 2. – Les stades du cancer de la prostate.

T1 = cancer localisé, peu avancé, T2 = cancer localisé, tumeur palpable, T3 = tumeur déborde de la prostate et T4 envahit les organes avoisinants.

Adaptée et reproduite avec la permission de Dr. Saad (1).

1.1.4. Traitements et progression

Le CP se divise en deux types principaux : hormono-sensible et résistant à la castration. Ces derniers peuvent soit être localisés, c'est-à-dire sans métastases, ou métastatiques. Dépendamment du type, la séquence des traitements va être différente (1, 28).

1.1.4.1. Le cancer de la prostate hormono-sensible

Plusieurs thérapies sont proposées pour les patients atteints d'un CP en fonction de son avancée. La surveillance active, la prostatectomie radicale, la radiothérapie ainsi que l'hormonothérapie sont les plus utilisées.

La surveillance active

La surveillance active est proposée aux hommes ayant été diagnostiqués pour un CP à un stade précoce et avec un risque de développement relativement lent. Un suivi du patient est réalisé tous les trois à six mois avec une mesure du taux d'APS sanguin, un toucher rectal et le prélèvement de biopsies de la prostate. Environ 25 à 30% des patients en surveillance active vont voir leur cancer se développer vers un stade plus agressif les conduisant ainsi à suivre des traitements plus contraignants.

La prostatectomie radicale

La prostatectomie radicale est une procédure chirurgicale qui consiste à retirer complètement la prostate d'un patient. Elle peut être réalisée par chirurgie ouverte, par laparoscopie (chirurgie avec petites incisions) ou par chirurgie laparoscopique assistée par robot (1). La chirurgie est priorisée lorsque le cancer est à des stades où il est encore confiné dans la prostate. Dans le cas où le cancer a commencé à atteindre les ganglions pelviens, ou si un doute est présent, une lymphadénectomie pelvienne est réalisée suivie de l'analyse de ces derniers par un pathologiste, en amont de la prostatectomie. Si le cancer a déjà formé des métastases dans les ganglions, d'autres types de traitement peuvent alors être proposés au patient. Le but principal de la chirurgie est d'enlever complètement toute trace de cancer chez le patient pour éviter sa réapparition. Un suivi est réalisé jusqu'à 5 ans après la chirurgie pour mesurer le risque de récurrence.

La radiothérapie

La radiothérapie a commencé à être utilisée dans les années 1950 comme traitement pour le CP (29, 30). Elle a pour but d'affecter la prolifération des cellules cancéreuses à l'aide de radiations ionisantes. Ces dernières vont induire des cassures au niveau des brins d'ADN induisant ainsi la mort cellulaire. Elle peut être administrée de deux façons : externe ou interne (1). La radiothérapie externe n'est pas invasive, une irradiation de plus de 70 Gy est alors effectuée à travers la peau à l'aide d'une machine qui cible une zone prédéterminée. La radiothérapie interne, ou brachythérapie, nécessite, quant à elle, une chirurgie car des implants radioactifs permanents ou temporaires sont installés directement dans la prostate. Le taux d'irradiation est dépendant du nombre d'implants déposés. Ce type de thérapie peut être utilisé comme alternative à une prostatectomie radicale.

L'hormonothérapie

Les cellules cancéreuses de la prostate sont hormono-dépendantes, c'est-à-dire que la présence de l'hormone sexuelle TST est essentielle pour leur développement (31, 32). Cet androgène est produit dans les testicules après stimulation par la *lutéinostimuline* (LH) formée dans l'hypophyse grâce à l'hormone de libération de la *lutéinostimuline* (LHRH) sécrétée par l'hypothalamus (Figure 3) (1). La TST est par la suite convertie en *5 α -dihydrotestostérone* (DHT) par la 5 α -réductase. La TST et la DHT vont se fixer sur le récepteur aux androgènes (RA) exprimé par les cellules épithéliales prostatiques. Le RA est un facteur de transcription qui va, après stimulation par l'androgène, migrer au noyau grâce à l'importin- α pour se fixer sur des *éléments de réponses aux androgènes* (ARE) et ainsi permettre la stimulation de la transcription de gènes, puis l'expression de protéines diverses importantes pour le développement des cellules prostatiques (33). Parmi ces protéines on y retrouve APS, la *transmembrane protease serine 2* (TMPRSS2), la *protéine kinase C delta* (PRKCD) ou encore la *pyrroline-5-carboxylate reductase 1* (PYCR1) (34, 35). Le but de l'hormonothérapie est donc de bloquer cette production de TST afin de réduire l'expansion des cellules tumorales prostatiques. Deux méthodes principales sont utilisées lors ce type de thérapie : la castration chirurgicale ou la castration chimique (Figure 3) (1). Dans le premier cas une orchidectomie est pratiquée et consiste à retirer les deux testicules. Ce type d'opération a commencé à faire son apparition dans les années 1940 et représente

aujourd'hui moins que 1% des cas d'hormonothérapie au Canada. Dans le deuxième cas, des analogues de la LHRH ou des inhibiteurs du RA sont utilisés. Les analogues, comme le leuproréline, goséréline ou le triptoréline vont avoir pour but de saturer l'hypophyse pour arrêter la production de LH et ainsi bloquer la production de TST (36, 37). Quant aux inhibiteurs du RA, comme le bicalutamide, ils vont bloquer l'action du récepteur en s'y fixant afin d'éviter sa liaison aux ARE (38). Ce dernier n'est pas efficace seul et se combine avec la castration dans certains cas.

Ce type de thérapie est souvent utilisé avec de la radiothérapie pour les cas de cancers à haut risque de récurrence afin d'augmenter l'efficacité du traitement, ou pour des patients qui ont récidivé après une prostatectomie radicale ou une radiothérapie.

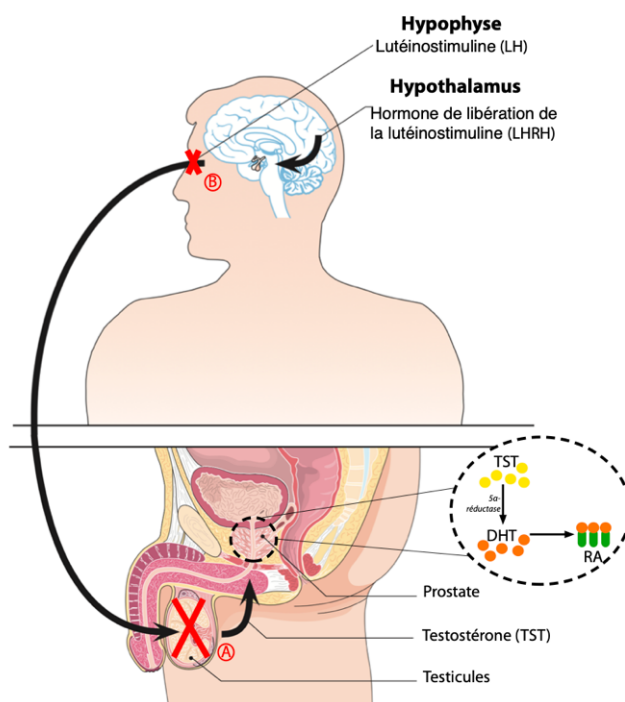


Figure 3. – Production de la testostérone et hormonothérapies principales.

Adaptée et reproduite avec la permission de Dr. Saad (1).

La chimiothérapie

Dans le cas où le cancer n'est plus confiné à la prostate et que des métastases sont présentes au niveau des sites métastatiques, de la chimiothérapie pourrait être prescrite. Au Canada, deux molécules de la famille des taxanes sont utilisées, soit le docétaxel et le cabazitaxel

(39, 40). Ces derniers inhibent la fonction des microtubules empêchant ainsi les cellules cancéreuses de se diviser et de se propager (41). Malheureusement, ce type de thérapie affecte aussi le fonctionnement des cellules normales. L'utilisation du docétaxel pour le CP métastatique hormono-sensible est assez récente et a démontré des effets bénéfiques sur la survie des patients (42, 43).

1.1.4.2. Le cancer de la prostate résistant à la castration

Mécanisme de résistance

Un CP résistant à la castration se caractérise par un développement du cancer outrepassant l'inhibition de la voie androgénique par l'hormonothérapie. Cette résistance passe principalement par le RA. Il a été démontré que dans environ 30% des cas l'expression d'ARNm codant pour le récepteur ainsi que son expression protéique étaient fortement augmentées dans les cellules du CP résistant à la castration (44-46). Cette surexpression du RA permet aux cellules cancéreuses d'être hypersensibles à des faibles niveaux d'androgène présents. Des mutations permettent aussi la production de variant du RA, comme le *variant d'épissage 7 du RA (RA-V7)*, qui est constitutivement actif et favorise le développement de la maladie (47, 48). Des études complémentaires ont aussi mis en avant que des ligands, autres que la TST, étaient capable d'activer le RA, c'est le cas par exemple de l'*interleukine-6 (IL-6)* (49).

Traitements utilisés

Dans le cas d'un CP résistant à la castration, plusieurs traitements sont possibles. Premièrement la castration chimique doit absolument être maintenue. La séquence de traitement dépend principalement des agents donnés en première ligne avant la progression de la maladie (50). Le patient peut soit être traité avec de la chimiothérapie, de l'immunothérapie (vaccin Sipuleucel-T, non disponible au Canada) ou avec un des agents d'hormonothérapie de nouvelle génération (abiratérone ou enzalutamide). Dans le cas d'une résistance à la chimiothérapie, et dépendamment de la stratégie thérapeutique employée précédemment, de l'hormonothérapie peut être de nouveau utilisée. Dans le cas de présence de métastases au niveau des os, des traitements complémentaires sont utilisés comme le dénosumab, inhibant *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)* et l'acide zélodronique. Ils permettent

d'éviter les complications osseuses dues à la présence de métastases (fracture, compression médullaire et paralysie) (1, 50).

Nouveaux traitements

Afin d'augmenter l'espérance de vie des patients, de nouveaux traitements sont présentement en essais cliniques. Ces derniers ciblent principalement la production androgénique et le RA (50, 51). Parmi eux sont retrouvés l'orterone qui inhibe l'activité de CYP17A1 importante pour la synthèse d'androgène dans les testicules ou encore le galeterone et l'ARN-509, tous deux antagonistes du RA (52-54). D'autres types de traitements indépendamment de la voie androgénique sont également testés. C'est le cas des inhibiteurs de PARP (PARPi), qui ciblent PARP1/2, une enzyme essentielle dans les mécanismes de réparation de l'ADN.

2. Mécanismes de réparation de l'ADN et cibles thérapeutiques

Les mécanismes de réparation de l'ADN jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du génome humain lors de divers stress endogènes ou exogènes. Il existe cinq types de mécanisme de réparation, qui vont chacun réparer un type de cassure en particulier : la réparation par excision de base (BER), la réparation des mésappariements (MMR), la réparation par excision de nucléotides (NER), la recombinaison homologue (HR) et la jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ) (Figure 4). Les cellules cancéreuses peuvent présenter des altérations de ces différentes voies ce qui engendre des mutations dans leur génome et augmente ainsi leur agressivité. Ces déficiences constituent cependant de potentielles cibles thérapeutiques intéressantes pour beaucoup de cancers, comme celui du sein, de l'ovaire ou encore récemment celui de la prostate.

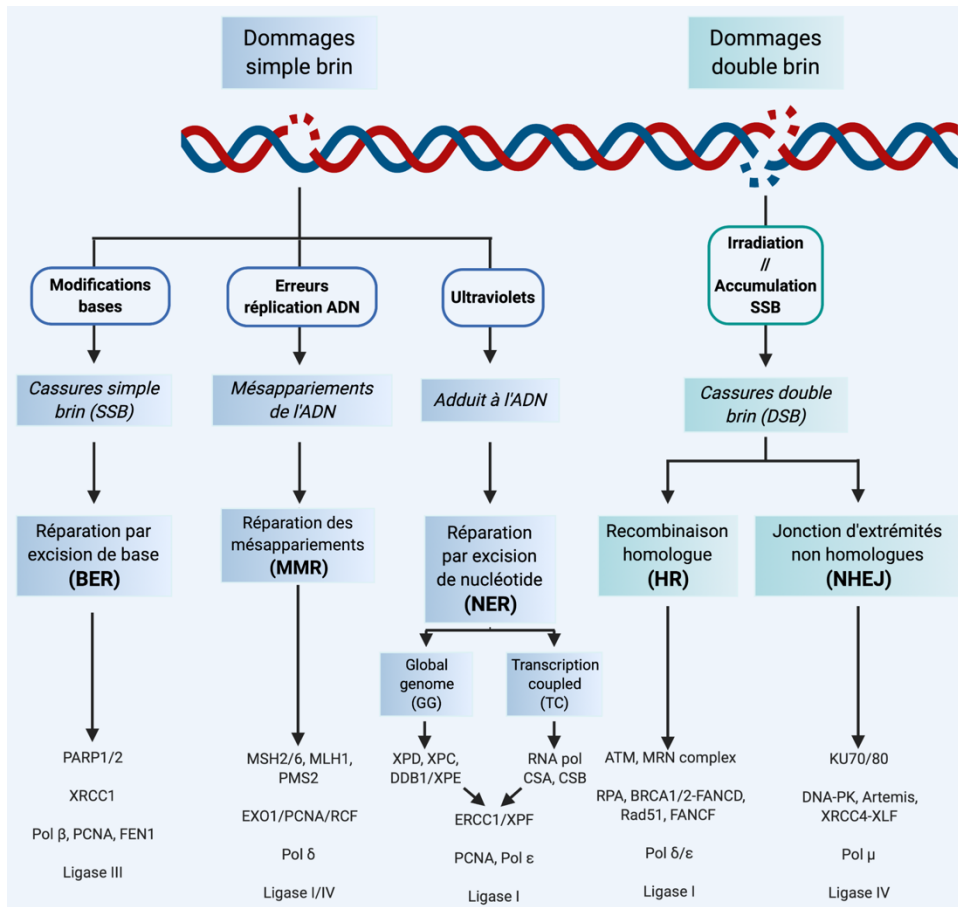


Figure 4. – Ensemble des différents mécanismes de réparation de l'ADN (55, 56).

2.1.1. Les différents mécanismes de réparation de l'ADN

2.1.1.1. Réparation des cassures simple brin

La réparation par excision de base (BER)

Ce système de réparation va principalement réparer les cassures induites par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les radiations ionisantes ou par des agents alkylants (Figure. 4) (57-59). Pour ce faire, une glycosylase d'ADN va d'abord reconnaître la base endommagée et la retirer pour créer un site abasique (AP). Ce dernier va être reconnu par une endonucléase AP qui va couper le brin d'ADN pour permettre à l'ADN polymérase beta (Pol β) de produire le nucléotide

manquant. L'ADN ligase III/XRCC1 est par la suite recrutée, à l'aide d'une PARylation induite par PARP1, pour lier l'ADN et ainsi finaliser la réparation (60, 61). Une version plus longue du BER existe aussi dans le cas où plusieurs nucléotides doivent être réparés. Elle fait intervenir plus d'acteurs dont *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) (62, 63).

La réparation des mésappariements (MMR)

Le MMR joue un rôle essentiel lorsque des erreurs d'appariement de base sont faites par la polymérase lors de la réplication de l'ADN (Figure 4) (64-66). Cette réparation est initiée par les *protéines de réparation des mésappariements d'ADN 2 et 6* (MSH2 et MSH6) qui vont reconnaître le mésappariement et permettre la fixation d'hétérodimères MutL α (MLH1/PMS2), MutL β (MLH1/PMS1) et MutL γ (MLH1/MLH3) afin d'inhiber l'incision du brin par une exonucléase. La synthèse du nouveau brin se fait par la *polymérase delta* (Pol δ) et sa liaison par l'ADN ligase I (66).

La réparation par excision de nucléotide (NER)

Le NER va principalement réparer les dommages de la double hélice d'ADN induit par exemple par l'exposition aux rayons ultraviolets (Figure 4). Il existe deux catégories de NER, une qui s'exerce sur l'ensemble du génome, *global genome* (GG), principalement sur les brins non-transcrits, et une autre qui répare les lésions des brins transcrits, *transcription coupled* (TC). Brièvement, lors du NER-GG, la protéine *Xeroderma pigmentosum, type C* (XPC) va se fixer sur les sites de distorsion de l'ADN alors que ce sont les protéines *CS complementation group B et A* (CSB et CSA) qui vont être recrutées aux sites de cassures après l'arrêt de la polymérase lors du NER-TC (67). Par la suite, les hélicases *Xeroderma pigmentosum type B et D* (XPB et XPD) sont recrutées dans les deux types de NER afin de permettre l'ouverture de l'hélice et sa stabilisation par *Xeroderma pigmentosum type A* (XPA). Le nouveau brin sera formé par la Pol δ et lié par l'ADN Ligase I (67).

2.1.1.2. Réparation des cassures double brin

La recombinaison homologue (HR)

Ce type de réparation permet de reconstruire le brin lésé par copie de la région homologue du brin complémentaire (Figure 4). Il intervient seulement lors de la réplication de l'ADN, c'est-à-dire pendant la phase S et G2/M et induit très peu d'erreurs (68). La cassure double brin est détectée par le complexe MRN composé de MRE11A-NBS1 et Rad50, permettant ainsi le recrutement de ATM et la résection du brin. Rad51 est par la suite chargé sur les extrémités simple brin et le complexe BRCA1/2-PALB2 est formé. Une boucle en D est initiée via Rad54 au niveau du chromosome homologue pour débiter la synthèse d'ADN en utilisant le brin comme amorce. La ligase I vient par la suite lier le nouveau brin pour reformer un ADN intact (68).

La jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ)

La NHEJ est un mécanisme de réparation qui intervient rapidement après une cassure double brin (Figure 4). Contrairement au HR, le NHEJ n'est pas un système de réparation fiable, il peut mener à de l'instabilité génomique du fait de la liaison des extrémités des brins doublement cassés (56). Cette liaison rapide mène souvent à l'apparition de mutations de certains gènes. Rapidement après l'apparition d'une cassure, l'hétérodimère Ku70/Ku80 se fixe sur l'ADN au niveau des extrémités des deux brins. Plusieurs protéines comme des nucléases (Artemis), des polymérases mais aussi la *protéinase dépendante de l'ADN* (DNA-PK) sont essentielles dans la liaison des deux brins (56).

2.1.1.3. Réparation de l'ADN dans les cancers

Il est désormais bien établi que des mutations au niveau de certains acteurs des voies de réparation de l'ADN peuvent favoriser le développement de différents cancers (69-71). En effet, le manque ou une mauvaise réparation des cassures peuvent mener à de l'instabilité génomique et à l'apparition de mutations. La mutation héréditaire la plus connue est celle de BRCA1 qui augmente le risque en moyenne de 55% à 72% de développer un cancer du sein et de 39% à 49% pour le cancer de l'ovaire (72, 73). On y retrouve aussi des mutations affectant les gènes codant

pour l'8-oxoguanine glycosylase (OGG1), intervenant dans le BER ou encore MSH2 et MSH6, pour le MMR et qui favorisent le développement du cancer colorectal, de l'ovaire et de l'estomac (74, 75).

Plusieurs gènes intervenant dans les mécanismes de réparation de l'ADN sont aussi mutés dans le CP, chez environ 30% des patients (Tableau 3) (76, 77). Ces mutations peuvent être ciblées afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques. C'est le principe des PARPi qui sont présentement en essais cliniques pour le CP (78-80).

Tableau 3. – Liste non exhaustive des mutations de gènes jouant dans la réparation de l'ADN chez des patients atteints d'un CP localisé ou avancé (76, 77).

Gènes	Mécanisme de réparation	Pourcentage des hommes touchés	
		Cancer de la prostate localisé	Cancer de la prostate avancé
BRCA2	HR	3%	13,3%
BRCA1		1%	1,9%
ATM		4%	7,3%
RAD51C		3%	0,14%
RAD51D		0%	0,4%
MLH1	MMR	0,6%	1,3%
MSH2		1,2%	2,7%
MSH6		1,4%	2%

2.1.2. Les inhibiteurs de PARP

2.1.2.1. Rôle de PARP dans les mécanismes de réparation de l'ADN

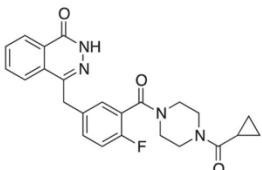
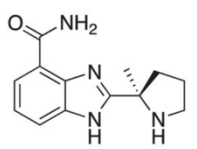
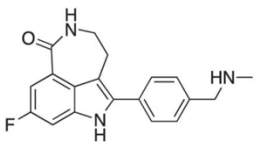
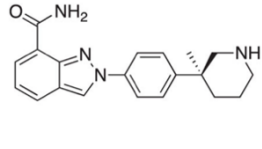
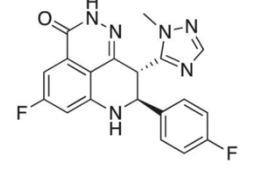
La famille enzymatique PARP est composée de 17 membres, dont PARP1 qui est celui le plus étudié. Parmi les protéines de cette famille, il a été mis en avant que PARP1, PARP2, PARP3 et PARP5A jouent un rôle important dans les mécanismes de réparation de l'ADN (81, 82). En effet

ces enzymes catalysent la formation de résidus d'ADP-ribose à partir du substrat *nicotinamide adénine dinucléotide* (NAD⁺) pour permettre la production et la fixation de chaînes de *poly(ADP-ribose)* (PAR) au niveau d'une cassure de l'ADN (83, 84). Cette PARylation permet de détendre la chromatine et de recruter des protéines intervenant dans la réparation de l'ADN comme XRCC1 lors BER. Cette chaîne de PAR est ensuite retirée par deux hydrolases, la *poly(ADP-ribose) glycohydrolase* (PARG) et l'*ADP-ribosylhydrolase 3* (ARR3). PARP1 peut aussi affecter les autres mécanismes de réparation de l'ADN. Des études ont mis en avant que l'activité enzymatique de PARP1 régule l'activation d'ATM, des DNA-PKcs, le recrutement de Mre11 pour la HR et le NHEJ, mais aussi celui de XPA et MSH6 pour le NER et MMR respectivement (85-87). Outre leur rôle dans les mécanismes de réparation de l'ADN, les PARP, en particulier PARP1, peuvent jouer dans le développement tumoral (88). Par exemple, il a été mis en avant que PARP1, grâce à sa fonction régulatrice de transcription et de modulation de la chromatine, pouvait affecter l'expression des gènes suppresseurs de tumeur (p53 et APC), réguler l'expression et l'activité de récepteurs d'hormones (RA et récepteur à l'estrogène) ou encore réguler l'adaptation et la survie cellulaire (HIF-1/2 ou NF-κB) (88-90). Des études ont ainsi décrit l'existence d'une corrélation entre l'augmentation d'expression de PARP et le développement de certains cancers comme celui de l'utérus ou du sein (91, 92).

2.1.2.2. Les inhibiteurs de PARP

En 1980, Purnell et Whish synthétisent la molécule 3-AB, premier inhibiteur ciblant PARP1. Ce n'est que 20 ans plus tard que les PARPi de seconde génération sont créés, avec une spécificité plus accrue (93, 94). À l'heure actuelle, cinq PARPi de troisième génération sont approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) et utilisés en clinique : l'olaparib (Lynparza), le rucaparib (Rubraca), le niraparib (Zejula), le talazoparib (Talzenna) et le veliparib (ABT-888) (Tableau 4).

Tableau 4. – Liste des inhibiteurs de PARP de troisième génération (82, 95, 96).

Nom	Structure	Cible	IC50 (nM)	Date d'approbation FDA et type de cancer ciblé
			PARP Trapping (potentialité 0 - 5)	
Olaparib (Lynparza)		PARP1/2/3	5,1/30	2014 (Cancer du sein)
			4	
Veliparib (ABT-888)		PARP1/2	5,2/2,9	2016 (Cancer du poumon)
			5	
Rucaparib (Rubraca)		PARP1/2	1,4/0,2	2016 (Cancer de l'ovaire)
			3	
Niraparib (Zejula)		PARP1/2	3,8/2,1	2017 (Cancer de l'ovaire)
			2	
Talazoparib (Talzenna)		PARP1/2	1,2/0,85	2018 (Cancer du sein)
			1	

Fonctionnement et principe de létalité synthétique

Les inhibiteurs de PARP entrent en compétition avec le NAD⁺ pour se fixer sur le site catalytique des PARP, empêchant ainsi la formation des chaînes PAR au niveau du bris du brin de

l'ADN. Le niveau d'affinité varie en fonction du PARPi, seul l'olaparib est ainsi capable d'affecter PARP3 en plus de PARP1 et PARP2 (95). Il a aussi été montré que les PARPi pouvaient stabiliser l'interaction de PARP1 et PARP2 avec l'ADN piégeant (*PARP trapping*) ainsi ces enzymes au site de cassures de l'ADN (97-99). Ce phénomène va induire un blocage de la réparation des cassures simple brin et donc leur accumulation. Comme pour leur affinité, leur potentialité de *PARP trapping* diffère entre eux. Le veliparib favorisera plus le piégeage des PARP1/2 comparativement au talazoparib (Tableau 4). Les PARPi vont donc inhiber la réparation de l'ADN.

Dans les années 1990 et début 2000 les PARPi étaient principalement utilisés comme agents permettant d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie et de la radiothérapie (82, 100). Effectivement, celles-ci induisent des cassures au niveau de l'ADN et l'inhibition de PARP menant à un blocage des mécanismes de réparation de l'ADN permet l'induction de la mort des cellules cancéreuses. Par la suite, deux études parues en 2005 ont mis en avant l'intérêt de l'utilisation de ces inhibiteurs comme thérapie anti-cancéreuse chez les patientes atteintes d'un cancer du sein ayant des mutations au niveau des gènes BRCA1/BRCA2 (101, 102). Le fonctionnement de cette nouvelle thérapie se base sur le principe de létalité synthétique. Ce dernier postule que le ciblage d'un gène B mène à la mort cellulaire dans le cas où un gène A, qui est le partenaire létal de B, est muté et non fonctionnel (Figure 5). Dans le cas du cancer du sein, le gène A équivaut aux gènes BRCA1/BRCA2 et le gène B à PARP1. Une mutation des gènes BRCA1/BRCA2 empêche les cellules cancéreuses d'utiliser la voie de la HR pour réparer les cassures double brin de l'ADN, les obligeant ainsi à utiliser le NHEJ à la place. Une inhibition de PARP1 par les PARPi va bloquer la réparation par le BER des cassures simple brin, qui vont se transformer en cassures double brin. En l'absence de HR fonctionnelle, le NHEJ va tenter de réparer ces multiples cassures menant ainsi à une accumulation d'erreurs de réparation et à la mort cellulaire par apoptose. D'autres gènes importants dans la HR peuvent aussi être utilisés comme partenaire létal de PARP1 comme ATM, ATR, Rad51/54 et CHK1/2 pour obtenir à une réponse similaire à celle d'une mutation de BRCA1/BRCA2 (103).

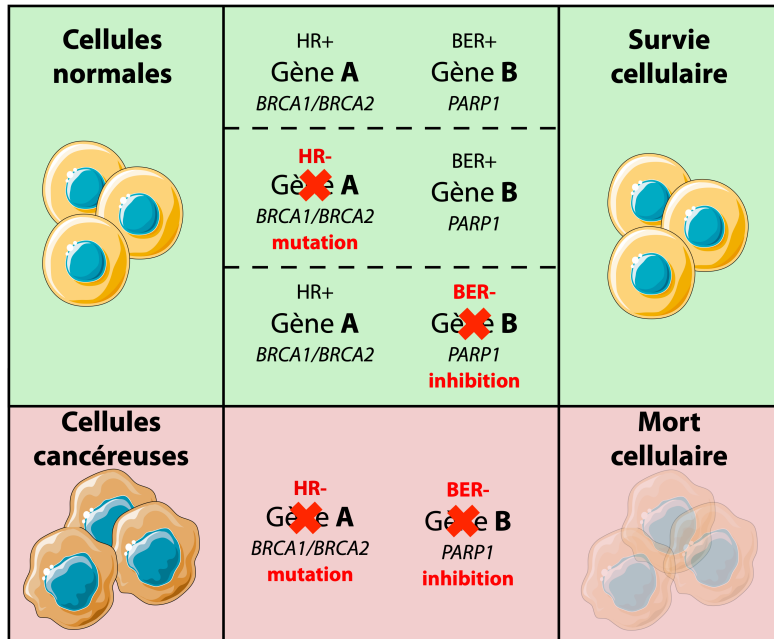


Figure 5. – Principe de létalité synthétique (104).

2.1.2.3. Utilisation clinique des PARPi contre le cancer de la prostate

Comme décrit précédemment, environ 30% des patients atteints d'un CP ont des mutations dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Tableau 3) (76, 77). Ceci explique pourquoi plusieurs essais cliniques sont en cours pour valider l'utilisation des PARPi en tant que monothérapie ou en thérapie combinée avec l'hormonothérapie ou la radiothérapie (Tableau 5) (78, 80, 96, 105-107). Deux de ces études en phase II ont mis en évidence une augmentation significative de la survie sans progression de la maladie de 2,4 à 9,8 mois en monothérapie (TOPARP-B, NCT01682772) (80) et de 8,2 à 13,8 mois en combinaison avec l'abiratérone (NCT01972217) (78). Cependant, environ 20% des patients ne répondaient pas à ces différents traitements. Même si aucune donnée n'est encore disponible sur le phénomène de résistance aux PARPi pour le CP, il est bien connu que plusieurs mécanismes peuvent jouer sur l'efficacité de ces inhibiteurs au cours du temps dans le cancer de l'ovaire et du sein.

Tableau 5. – Liste de certains essais cliniques pour le CP résistant à la castration utilisant les PARPi (96).

Numéro de l'étude	Phase	Population ciblée	Traitements
Monothérapie			
TALAPRO-1 (NCT03148795)	Phase II	CP métastatique, mutations sur des gènes de réponse aux dommages de l'ADN et résistant à l'hormono/chimiothérapie	Talazoparib
Galahad (NCT02854436)	Phase II		Niraparib
PROfound (NCT02987543)	Phase III	CP métastatique et résistant hormonothérapie	Olaparib
Thérapie combinée			
PROpel (NCT03732820)	Phase III	CP métastatique et sans traitement préalable	Abiraterone et olaparib
MAGNITUDE (NCT03748641)	Phase III	CP métastatique, mutations ou non sur des gènes de réponse aux dommages de l'ADN	Abiraterone et niraparib
TALAPRO-2 (NCT03395197)	Phase III	Symptômes faibles à moyens de CP métastatique et sans traitement préalable	Enzalutamide et talazoparib

2.1.2.4. Phénomènes de résistance

Environ 40 à 70% des patientes atteintes d'un cancer du sein ne répondent pas ou vont développer au cours de leur traitement une résistance, respectivement innée ou acquise, aux PARPi (108). La résistance innée est principalement régulée par l'efficacité *de novo* de la HR, qui doit être inactive pour induire la létalité synthétique (Figure 5). La résistance acquise quant à elle peut être due à trois mécanismes principaux distincts : la restauration de la HR, la stabilisation de la fourche de réplication ou encore l'altération de la cible des PARPi ou de leur transport (109). Le premier mécanisme est caractérisé par l'induction de mutations inverses au niveau des gènes

BRCA1/BRCA2 permettant ainsi leur réexpression et la restauration de la HR (110, 111). D'autres mutations peuvent aussi permettre cette reprise de la HR, en particulier celles induisant la perte d'expression de *tumor suppressor P53-binding protein* (53BP1) et de dynein light chain LC8-type 1 (DYNLL1) ou encore celles permettant une surexpression de Rad51 (112-115). Le deuxième mécanisme met en avant l'inhibition de l'activité de deux méthyltransférases, l'*enhancer of zeste homolog 2* (EZH2) et *PAX interacting protein 1* (PTIP). Ces protéines sont importantes pour le recrutement des nucléases MUS81 et MRE11 qui induisent un effondrement de la fourche de réplication dans les cellules déficientes en BRCA1/2. Ce blocage permet de protéger la fourche de réplication de l'action des PARPi (116, 117). Le dernier mécanisme est centré sur les mutations et les modifications post-traductionnelles présentes au niveau de la protéine PARP1 qui ont été détectées (118, 119). Les mutations des résidus K199 et S120 empêchent ainsi la fixation de PARP1 sur les sites de cassures et l'hyper-phosphorylation de PARP1 par MET qui bloque son activité catalytique. L'export des PARPi par les cellules cancéreuses grâce aux pompes ABCB1 fait aussi parti de cette troisième catégorie de résistance (120). Finalement, l'autophagie, un mécanisme d'homéostasie cellulaire, commence à être accepté comme un acteur pouvant avoir un rôle dans la résistance aux PARPi. Effectivement, plusieurs études ont mis en avant qu'une inhibition de cette voie permettrait d'augmenter l'efficacité de ces inhibiteurs (121-123).

3. L'autophagie

3.1.1. Principe et caractéristiques

Dans les années 50, des chercheurs ont décelé l'existence dans les cellules d'organites particuliers, les lysosomes, ainsi que des vacuoles qui leur sont associées (124-126). Ce n'est qu'en 1963 durant la conférence *Ciba Foundation Symposium on Lysosomes* que le terme d'« autophagie » a été introduit par le Dr. Christian de Duve (127, 128). Il correspond à un mécanisme d'autodigestion de la cellule pour assurer son homéostasie. La caractérisation moléculaire de l'autophagie a principalement débuté en 1993 avec la découverte dans les levures *Saccharomyces cerevisiae* de gènes importants dans le processus autophagique, nommés par certains chercheurs *autophagie* (APG), *autophagie* (AUT) ou encore *cytoplasm-to-vacuole targeting* (CVT) (129-131). Dans le but d'uniformiser les diverses appellations, l'ensemble de ces

gènes ont été appelés des *autophagy-related genes* (ATG) en 2003 (132). Actuellement, trois types majeurs d'autophagie ont été décrits : la macro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) et la microphagie, régulée par les lysosomes (133). Le premier type, appelé plus communément autophagie et divisé en deux sous-types, canonique et non-canonique, est le plus étudié dans la littérature car il est celui qui est majoritairement retrouvé chez les mammifères. Cette autophagie est caractérisée par la production d'acides aminés grâce à la dégradation lysosomale des protéines cellulaires de longue vie, d'agrégats ou d'organites usés. Elle est donc considérée comme un mécanisme adaptatif permettant à la cellule de surmonter des stress tels que la déprivation de nutriments ou encore l'hypoxie. Cette autophagie se déroule en 5 étapes : 1. Activation par la *protéine cible de la rapamycine chez les mammifères* (mTOR), 2. Initiation de la formation du phagophore (PAS), 3. Maturation du PAS en autophagosomes (AV), 4. Fusion de l'AV avec un lysosome pour donner un *autolysosome* (AL) et 5. Dégradation du contenu du AL pour produire de l'énergie. (Figure 6).

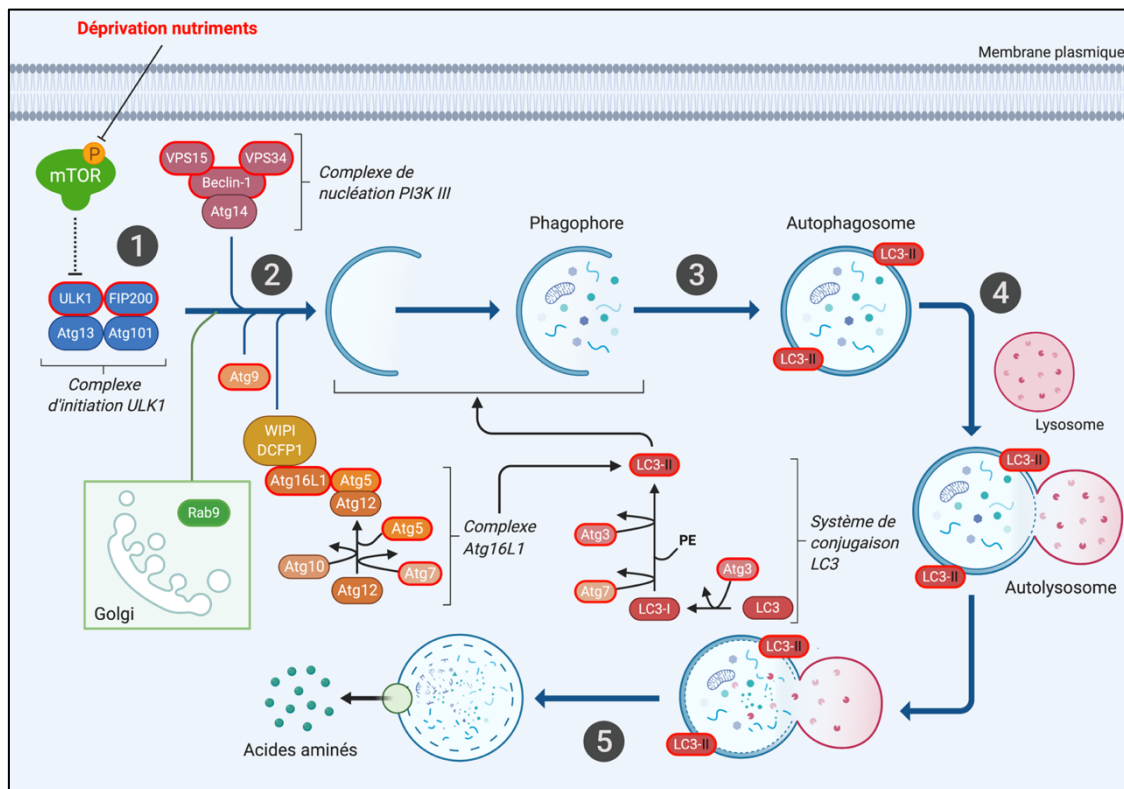


Figure 6. – Principe d'autophagie canonique et non-canonique.

L'autophagie non-canonique est indépendante des protéines entourées en rouge et utilise Rab9 pour l'initiation de la formation du phagophore (134, 135).

Réalisée sur BioRender.

3.1.1.1. L'autophagie canonique

Initiation du phagophore et maturation en autophagosome

L'autophagie est principalement régulée par le complexe mTORC1 situé au niveau des lysosomes (136). Ce complexe est composé des protéines que sont mTOR, la *protéine d'interaction mTOR contenant un domaine DEP* (DEPTOR), le *complexe de la cible de la rapamycine sous-unité LST8* (mLST8), la *protéine associée régulatrice de mTOR* (Raptor) et le *substrat d'Akt de 40 kDa riche en proline* (PRAS40). Il va ensuite interagir avec des GTPases apparenté à Ras A, B, C et D (Rags) et *Ragulator*. Ceci permet au complexe de s'ancrer à la membrane des lysosomes et d'être sensible aux concentrations d'acides aminés présents dans le milieu intracellulaire (137). Une fois activé par phosphorylation via la protéine *Ras homolog enriched in brain* (Rheb), mTORC1 va permettre d'induire la synthèse protéique, lipidique et lysosomale ainsi que d'inhiber l'autophagie par, respectivement, la phosphorylation de la *protéine ribosomale S6 kinase beta-1* (p70-S6K), de *lipine 1* (LPIN1), du *facteur de transcription EB* (TFEB) et de *unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1* (ULK1) (138). Lors d'une déprivation de nutriments ou d'acide aminés, mTORC1 va se détacher des lysosomes et ne sera plus phosphorylé par Rheb. Ceci va permettre d'augmenter la production des lysosomes via la translocation au noyau et la fixation de TFEB sur des éléments de *coordination d'expression et de régulation des lysosomes* (CLEAR) (139). En parallèle, le complexe ULK1 composé d'ULK1, d'ATG13, ATG101 et de la *protéine d'interaction de 200 kDa de la famille des kinases d'adhésion focales* (FIP200) va être activé. Cette activation permet l'initiation de la machinerie autophagique (140, 141). Le complexe ULK1 va par la suite recruter le complexe PI3K III composé principalement de Beclin-1 et de la *phosphatidylinositol-3 kinase de classe III* (VPS34) via phosphorylation du *régulateur d'autophagie et de beclin-1* (Ambra1) au niveau du site d'initiation de formation du PAS proche du réticulum endoplasmique (ER). Ambra1 est nécessaire pour la « capture » du contenu à dégrader. Afin de stabiliser le complexe, elle peut interagir avec le *récepteur associé au facteur*

TNF 6 (TRAF6) ce qui va permettre l'ubiquitination d'ULK1 augmentant l'activité d'ATG14L contenu dans le complexe PI3K III. Ces étapes vont être importantes pour la production de *phosphatidylinositol-3-phosphate* (PI3P) par VPS34 (142). Ce phospholipide nouvellement formé va permettre le recrutement des protéines effectrices dans la formation du PAS que sont *double FYVE-containing protein 1* (DFCP1) et *WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein* (WIPI) (143). Cette dernière va par la suite interagir avec Atg16L1 pour amener le complexe Atg5-Atg12-Atg16L1 à la membrane du PAS et permettre sa maturation en autophagosome (AV) (144, 145). Une des protéines essentielles dans l'autophagie canonique est Atg8, nommée LC3 chez les mammifères et LC3-II sous sa forme lipidée. Une fois que LC3 est clivée en LC3-I par Atg4, les protéines Atg3 et Atg7 vont catalyser l'ajout d'un groupement de *phosphatidyléthanolamine* (PE), avec l'aide du complexe Atg5-Atg12-Atg16L1, sur la protéine pour former de LC3-PE, nommée plus communément LC3-II (146, 147). Cette nouvelle structure à double membrane lipidique contient les éléments à dégrader. Une des protéines qui est retrouvée dans celle-ci est le *sequestosome-1* (SQSTM1/p62). Elle détient un domaine d'*ubiquitination associé* (UBA) qui lui permet de reconnaître les protéines ubiquitinées, les fixer et les amener à dégradation dans les AV en interagissant avec LC3 (148).

Formation de l'autolyosome et recyclage des lysosomes

Lorsque l'AV est complètement formé, il va être déplacé, à l'aide du complexe dynéine-dynactine, vers le côté négatif des microtubules jusqu'en position péri-nucléaire où se situe principalement les lysosomes (Figure 7, étape 1) (149, 150). Cette interaction avec les microtubules est rendue possible grâce à la petite GTPase Rab7 qui est capable d'interagir avec la *protéine lysosomale d'interaction Rab* (RILP) et le *senseur au cholestérol* (ORP1L) (Figure 7, étape 2) (151, 152). Une fois dans la région péri-nucléaire, le complexe contenant la *protéine 29 associée aux synaptosomes* (SNAP29) et la *syntaxine 17* (STX17) est recruté au niveau des AV. Rab7 ainsi que la *protéine membranaire associée aux vésicules 8* (VAMP8) sont, elles, recrutées au niveau des lysosomes. Des protéines de « liaison » comme la *ectopic P-granules autophagy protein 5 homolog* (EPG5) ou encore la *pleckstrin homology and run Domain containing M1* (PLEKHM1) vont ensuite reconnaître LC3 et Rab7 au niveau, respectivement, des AV et des lysosomes pour permettre leur fusion (147, 153, 154). Des études ont aussi mis en avant que la

concentration de certains phospholipides (PI) était également importante dans cette fusion mais leur rôle exact est encore mal compris (155-157). En effet, la production de *phosphatidylinositol-4-phosphate* (PI4P) induit par le recrutement de *membrane-bound phosphatidylinositol-4 kinase* (PI4KII α) à la membrane des AV et celle de PI3P par l'*inositol Polyphosphate-5-Phosphatase E* (INPP5E) au niveau des lysosomes semblent être indispensables à la fusion. Lorsque l'AL est formé, le contenu en acides lysosomaux est déversé dans les AV ce qui entraîne la dégradation de leur contenu. Les produits nouvellement formés, que sont les acides aminés et les sucres, sont exportés des AL par des transporteurs membranaires lysosomaux, comme le *lysosomal amino acid transporter-1* (SLC36A1) ou *spinster* (Spin) (158-160).

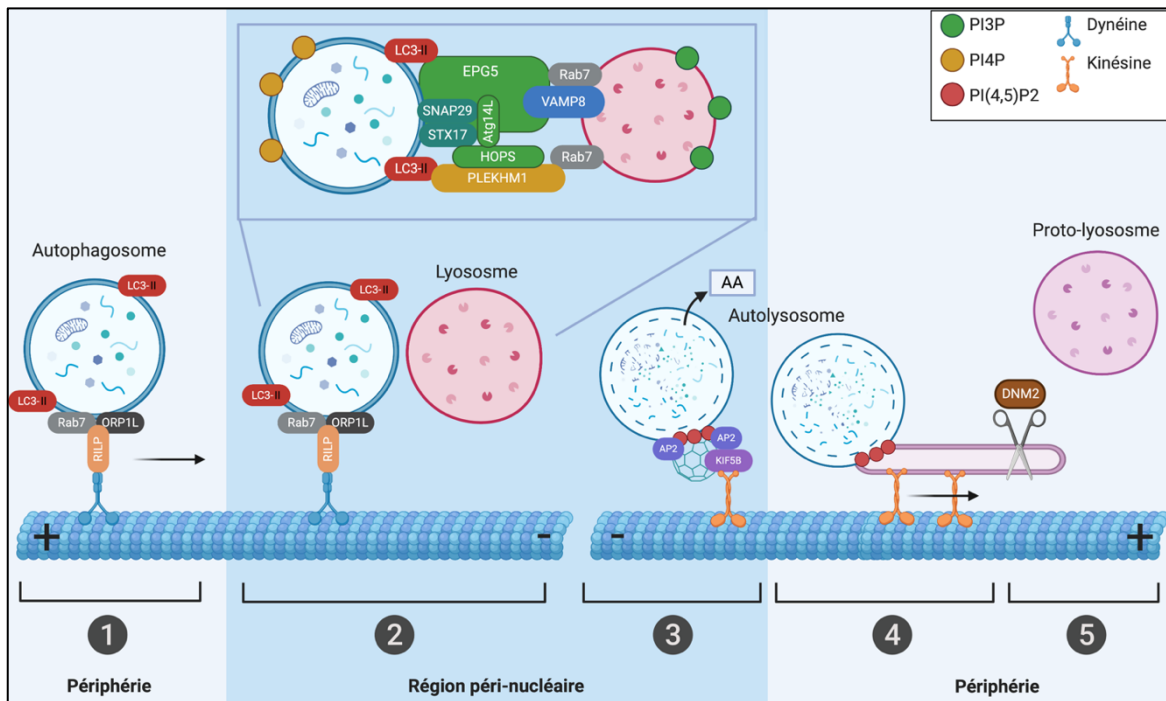


Figure 7. – Principe de formations des autolysosomes et recyclage lysosomale (161).

Réalisée sur BioRender.

Récemment, des études ont mis en évidence un phénomène de *recyclage des lysosomes autophagiques* (ALR) à la suite de la réactivation de mTOR par les acides aminés nouvellement formés (Figure 7, étape 3 à 5) (160, 162-165). Cette ALR se traduit par l'élongation d'une partie de l'AL en tubule le long des microtubules (165). Cette extension est initiée par la formation de

micro-domaines riches en *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate* (PI(4,5)P₂) formés par l'enzyme *phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type 1 beta* (PIP5K1B), micro-domaines qui vont être reliés à la clathrine à l'aide de l'*adaptor protein 2* (AP2) (Figure 7, étape 3) (164). Ils vont ensuite permettre le recrutement du *membre 5 de la famille des kinésine* (KIF5B) qui va induire la formation de tube de l'AL tout le long des microtubules (Figure 7, étape 4). À un certain moment de cette élongation, la GTPase *dynamine 2* (DNM2) va découper l'extrémité de celle-ci pour permettre la formation de proto-lysosomes fonctionnels pouvant être réutilisés par la cellule (Figure 7, étape 5) (166).

3.1.1.2. L'autophagie non-canonique

Ce second sous-type d'autophagie a été observé pour la première fois en 2007 lors de la découverte, malgré l'inhibition du complexe PI3K, de vacuoles autophagiques chez des plantes et des mammifères (167, 168). La différence majeure entre ce sous-type et l'autophagie canonique réside dans la dépendance de ce dernier à l'expression de certaines protéines dont beclin-1, Atg5, Atg7, Atg9, Atg12 et Atg16 (Figure 6) (169, 170). En l'absence des diverses Atg ne permettant pas la lipidation de LC3-I en LC3-II, indispensable pour la maturation de l'autophagosome, l'autophagie canonique ne peut se faire. L'autophagie non-canonique utiliserait plutôt la GTPase Rab9, pour permettre la formation du phagophore (170). L'ensemble du mécanisme est encore peu connu et peu étudié.

3.1.2. Acteur et cible thérapeutique dans le cancer

L'autophagie est connue pour avoir deux rôles opposés dans le développement des cancers. En effet, en fonction du type de cancer et du stade, elle est soit anti-oncogénique ou soit pro-oncogénique (171, 172). Elle joue aussi un rôle majeur dans l'apparition de mécanismes de résistance aux agents thérapeutiques.

3.1.2.1. L'autophagie acteur oncogénique

Rôle anti-oncogénique

Le rôle anti-oncogénique de l'autophagie est caractérisé par sa capacité à maintenir l'intégrité du génome et à inhiber l'inflammation au niveau du microenvironnement tumoral

(171). Ceci est dû à son rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire lui permettant de dégrader tout élément cellulaire pouvant déstabiliser cet équilibre. C'est le cas par exemple des ROS et de SQSTM1/p62 qui affectent la stabilité génomique, favorisent l'apparition de mutations et ainsi le développement tumoral (173-175). Des études complémentaires ont aussi mis en avant que la *neuropilin 1*, la protéine régulatrice du *facteur de croissance de l'endothélium vasculaire* (VEGF) essentielle dans l'angiogenèse, était dégradée lors du processus autophagique, réduisant ainsi le développement tumoral (176). Dans une vaste majorité de cancers, comme celui du foie ou encore du sein, une corrélation existe entre la diminution d'activité autophagique et le développement de la maladie. Ainsi, dans les premiers stades de ces maladies, l'expression des protéines essentielles au processus autophagique, comme beclin-1 ou Atg5/7/12 est fortement diminuée réduisant ainsi les niveaux d'autophagie (177-180). L'autophagie peut aussi être augmentée pour limiter le processus métastatique comme dans les cancers hépatiques et gastriques où elle inhibe la *transition épithélio-mésenchymateuse* (TEM) (181-183).

Rôle pro-oncogénique

Les deux rôles principaux pro-oncogéniques de l'autophagie sont liés à sa capacité à réguler les stades avancés métastatiques et à protéger les cellules cancéreuses contre les traitements thérapeutiques (172, 184). Il a été démontré que l'autophagie pouvait favoriser la dissémination, des cellules cancéreuses, la colonisation d'un organe cible mais aussi la survie des métastases dans leur nouvel environnement dans les cancers du sein et du poumon (185-187). Ces études ont mis en avant qu'une inhibition de l'autophagie permettait de diminuer l'invasion des cellules épithéliales sur-exprimant RAS, de diminuer la sécrétion d'IL-6 mais aussi de diminuer l'expression de la *métalloprotéinase 2* (MMP2) impliquée dans le potentiel invasif des métastases. L'autophagie est également considérée comme un mécanisme de *résistance multidrogue* (MDR), comme la régulation de l'export et de l'import des drogues par les transporteurs ABC ou encore les mutations spontanées (188). Plusieurs mécanismes ont ainsi été décrits pour comprendre comment l'autophagie peut réguler la résistance aux traitements anti-cancéreux. Par exemple, une étude parue en 2011 a découvert que certaines chimiothérapies étaient piégées dans les lysosomes afin de réduire leur disponibilité dans la cellule et ainsi réduire leur efficacité (189).

Des travaux complémentaires menés quelques années après ont mis en avant que ce piégeage induisait la translocation de TFEB au noyau ce qui augmentait la biogénèse lysosomale mais aussi l'activation de l'autophagie via l'inhibition de mTOR (190, 191). Les transporteurs ABC exprimés au niveau de la membrane des lysosomes pourraient aussi faciliter ce piégeage des drogues. C'est le cas par exemple d'ABCA3 qui est surexprimé chez les patients atteints de leucémie et qui est corrélé avec la résistance à l'imatinib (192, 193). Au total, une dizaine d'agents thérapeutiques, dont le lapatinib, la doxorubicine ou encore le sunitinib, peuvent être piégés dans les lysosomes (189, 194-196). L'autophagie peut aussi réguler les autres acteurs du MDR. En effet, plusieurs groupes de recherche ont décrit que l'activation de l'autophagie pouvait induire une augmentation de l'export des agents chimiothérapeutiques par la *P-glycoprotéine* (P-gp) et une augmentation d'expression de la *protéine associée à la résistance multidrogue 1* (MDR1) (197, 198). L'autophagie peut aussi affecter les mécanismes de réparation de l'ADN en limitant l'effet des cassures induites par les traitements chimio et radiothérapeutiques. C'est le cas par exemple pour la capsaïcine dans le cancer du sein où l'activation de l'autophagie permet une réparation de l'ADN plus efficace (199).

L'importance de l'autophagie dans le développement de résistance aux agents thérapeutiques en fait donc une cible idéale pour limiter ce phénomène.

3.1.2.2. L'autophagie comme cible thérapeutique

Selon l'avancée du cancer, des inhibiteurs ainsi que des activateurs d'autophagie sont utilisés comme traitement anti-cancéreux.

Pour les inhibiteurs, il existe deux groupes principaux : les inhibiteurs qui vont cibler les premières étapes de l'autophagie (initiation, nucléation et élongation du PAS) et ceux qui vont cibler les dernières étapes (formation des AL) (Tableau 6). Le premier groupe est constitué d'inhibiteurs de ULK1/2, ATG4B ainsi que de VPS34 (200). Ces inhibiteurs n'ont pas été approuvés par la FDA limitant ainsi leur utilisation en clinique. Cependant, l'ensemble des études ont mis un avant un effet bénéfique sur la réponse aux traitements chimiothérapeutiques et un impact sur le développement tumoral dans les cancers du sein, du poumon, de l'ovaire ou encore celui du foie (201-205). Le deuxième groupe est constitué de la *bafilomycine A1* (Baf A1), la *chloroquine* (CQ)

et l'*hydroxychloroquine* (HCQ). Ces derniers permettent de perturber l'intégrité de la membrane lysosomale empêchant ainsi la formation des AL. Les essais cliniques utilisent principalement la CQ et l'HCQ qui ont été approuvées par la FDA en 1949 et 1955 comme traitement contre la malaria. Ce n'est qu'en 1970 qu'est apparue la première étude mettant en avant les effets anti-cancéreux de la CQ dans les cas de lymphome et de mélanome (206). Vingt-huit ans après il a été découvert que l'efficacité de la CQ était due à son impact sur l'inhibition de l'autophagie (207). Le premier essai clinique réalisé sur les patients ayant un glioblastome a par la suite été initié en 2003 (208). Depuis, environ une trentaine d'essais cliniques ont été réalisés ou sont en cours, en monothérapie ou thérapie combinée (Tableau 6). Pour le CP, cinq essais cliniques utilisant la CQ sont d'actualité afin de diminuer la progression tumorale ou pour limiter la rechute biochimique (209, 210). Une augmentation croissante de données précliniques mettant en avant l'effet bénéfique du ciblage de l'autophagie pour améliorer l'efficacité de l'hormonothérapie et de la chimiothérapie devrait permettre un élargissement de ces essais cliniques dans les prochaines années (211-214).

D'autres études utilisent des activateurs d'autophagie pour permettre d'augmenter l'efficacité des traitements thérapeutiques. Ces activateurs regroupent les inducteurs de stress du RE, les inhibiteurs de mTOR, d'*inositol monophosphatase* (IMPase) et de calpain (Tableau 6) (215). Les inhibiteurs de mTOR étant approuvés par la FDA, ils sont les plus employés lors des essais cliniques. Les résultats préliminaires obtenus mettent en avant une amélioration modeste de la réponse aux agents thérapeutiques dans le cancer du sein et de la prostate en raison de leurs effets secondaires importants (216, 217). De plus amples études ou le développement de dérivés moins toxiques devraient être réalisés. Les études précliniques avec des inhibiteurs d'IMPase et de calpain ont démontré l'efficacité de ces composés pour diminuer la progression tumorale dans les cancers du sein, du colon et du foie (218-222).

Tableau 6. – Liste des modulateurs d'autophagie utilisés comme thérapie anti-cancéreuse (200, 215).

Étape autophagique	Action	Cible	Composé	Types de cancer ciblés	Références
<i>Études précliniques</i>					
Initiation	Inhibiteur	ULK1/2	MRT67307	Poumon, leucémie, rein	(204, 205, 223)
Nucléation			SBI-0206965		
Élongation		VPS34	SB02024	Sein, peau	(201, 202)
			ATG4B	NSC185058	Os
Formation des AL	Lysosomes	Bafilomycine A1	Gastrique, foie, ovaire	(226, 227)	
Initiation	Activateur	Stress RE	Tunicamycine	Colon, gastrique, sein	(219-221)
		IMPase	Carbamazepine	Foie, colon	(218, 222)
<i>Études en essais cliniques</i>					
Formation des AL	Inhibiteur	Lysosomes	HCQ CQ	Glioblastome	NCT02378532
				Sein	NCT03774472 (228)
				Poumon	NCT00977470 (229)
				Prostate	NCT03513211 (209) NCT01480154 (210) NCT05036226
Initiation	Activateur	mTORC1	Temsirolimus	Prostate	NCT00919035 NCT01083368 (217)
			Sirolimus	Sein	NCT01827943 (216)

3.1.3. Autophagie et réparation de l'ADN

L'autophagie étant un mécanisme d'homéostasie cellulaire, plusieurs groupes de recherche ont étudié sa capacité à réguler les mécanismes de réparation simple et double brin de l'ADN (Figure 8) (230-234). Cette régulation est un élément clé dans la réponse anti-cancéreuse aux PARPi comme thérapie anti-cancéreuse.

3.1.3.1. Intervention de l'autophagie dans la réparation de l'ADN

Rôle dans la réparation double brin

Le rôle de l'autophagie dans les mécanismes de réparation de l'ADN double brin est le mieux décrit dans la littérature et le plus étudié comparativement à ceux impliqués dans la réparation des cassures simple brin. Trois acteurs majeurs, inhibés par l'autophagie, peuvent affecter la HR en interférant dans le recrutement de BRCA1 et RAD51 au niveau des sites de cassures de l'ADN (Figure 8). Il a été démontré que l'autophagie était capable de dégrader la *protéine-1 associée à KRAB* (KAP1) permettant d'augmenter la transcription de BRCA1 par le *signal transducteur et activateur de transcription 3* (STAT3) et ainsi accroître l'efficacité de la HR (235, 236). La *protéine hétérochromatine 1 alpha* (HP1 α), une fois ubiquitinée par l'*ubiquitin-conjugating enzyme E2 2* (RAD6) à la suite d'une irradiation, est dégradée par l'autophagie pour assurer la fonctionnalité de la HR (237). Finalement, la dégradation de la protéine SQSTM1/p62 par l'autophagie joue aussi sur la HR en diminuant sa concentration cellulaire et donc en réduisant la dégradation de FLNA par le protéasome. Le maintien de l'intégrité de FLNA va assurer le recrutement de RAD51 aux sites de cassures (231). Des études ont aussi indiqué que SQSTM1/p62 pouvait réguler la HR en inhibant l'activité de l'E3 ubiquitine ligase RNF168 réduisant ainsi l'ubiquitination de l'*histone H2A* (H2AX), essentielle dans le recrutement des effecteurs de la HR (238, 239).

Rôle dans la réparation simple brin

Le rôle de l'autophagie dans le BER est encore peu connu contrairement au NER. Le peu d'études publiées semblent indiquer une corrélation entre la forte expression de OGG1 et celle d'ATG7 impliquée dans l'induction de l'autophagie (234, 240). De plus, l'*AP endonucléase 1* (APE1)

induirait aussi la phosphorylation de CHK1 qui régulerait l'autophagie par la suite (241). Pour ce qui est du NER, l'autophagie augmenterait l'expression de XPC via la dégradation de *twist-related protein 1* (TWIST1) et favoriserait la reconnaissance du bris de l'ADN par la protéine de liaison de l'ADN endommagé 2 (DDB2) (230). Des activateurs d'autophagie comme *AMP-activated protein kinase* (AMPK) et *UV radiation resistance associated* (UVRAG) sont aussi capables de réguler le NER en affectant l'expression et le recrutement de XPC et XPA respectivement (242, 243).

Ce rôle de l'autophagie dans les mécanismes de réparation de l'ADN en fait une cible idéale dans l'optique d'outrepasser les phénomènes de résistances innée ou acquise des PARPi.

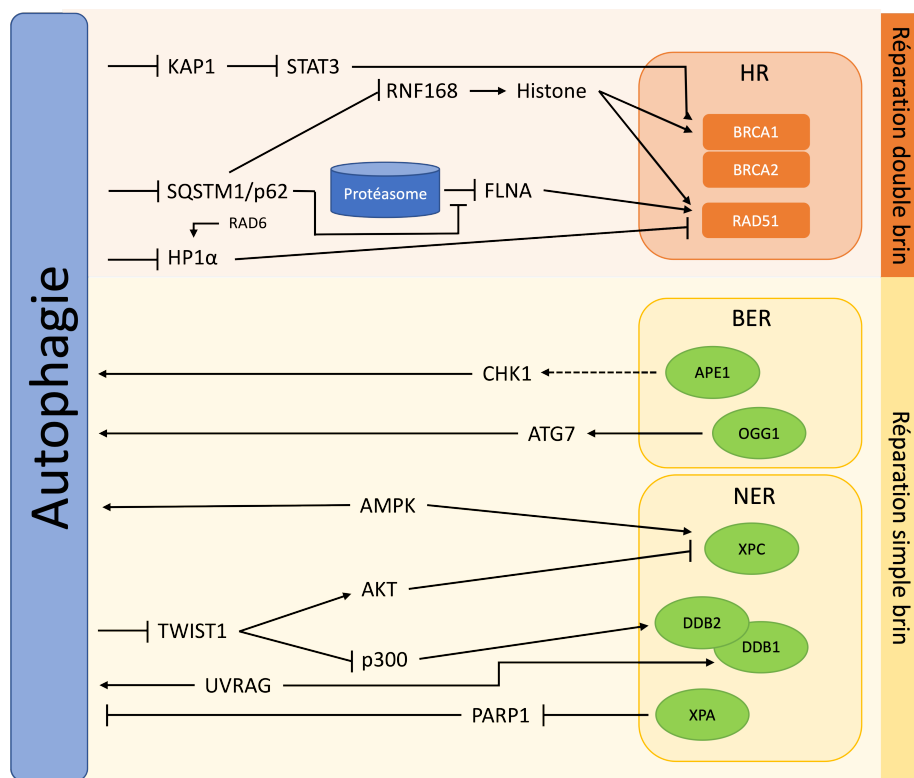


Figure 8. – Rôle de l'autophagie dans les mécanismes de réparation de l'ADN (244).

3.1.3.2. L'autophagie et inhibiteurs de PARP

L'importance de l'autophagie dans la réponse aux PARPi n'a cessé de croître ces dernières années. En effet, plusieurs études ont mis en avant que les cellules cancéreuses activaient leur

autophagie à la suite d'un traitement aux PARPi pour limiter leurs effets (121-123). Ces mêmes études ont suggéré que cibler cette induction d'autophagie permettait d'augmenter l'efficacité de limiter le phénomène de résistance aux PARPi (Tableau 7). Malheureusement celles-ci ne décrivent pas la mécanistique responsable de cette résistance régulée par l'autophagie. À l'heure actuelle aucune étude clinique n'a encore été réalisée combinant autophagie et PARPi dû au manque de données dans les études pré-cliniques.

Tableau 7. – Liste non exhaustive des études pré-cliniques ciblant l'autophagie en combinaison avec les PARPi.

PARPi utilisé	Cible	Type de cancer	Modèle d'étude	Référence
Talazoparib	CQ	Sein	<i>in vivo</i>	(123)
		Leucémie		(245)
		Ovaire		(246)
Olaparib	shRNA ATG5	Sein	<i>in vitro</i>	(121)
	Inhibiteur de ULK1/2			(247)
	shRNA BAG3			Ovaire
Niraparib	CQ	Langue	<i>in vivo</i>	(122)
	CQ	Foie		(249)

4. Projet de thèse

4.1.1. Problématique

Les PARPi sont utilisés depuis plusieurs années pour lutter contre les cancers du sein et de l'ovaire. Ils sont principalement efficaces chez les patientes ayant des mutations au niveau des gènes de réparation de l'ADN. La présence de ces mutations, chez environ 30% des hommes atteints d'un cancer de la prostate, a permis l'initiation de plusieurs essais cliniques pour leur utilisation en monothérapie ou en combinaison avec l'hormonothérapie et la chimiothérapie.

Alors que les phénomènes de résistance aux PARPi sont de mieux en mieux compris dans le cancer du sein et de l’ovaire, ceux-ci restent encore très peu étudiés dans le cancer de la prostate. Plusieurs études suggèrent que l’autophagie pourrait avoir un rôle dans la réponse aux PARPi mais aucune d’entre-elles n’a démontré ce rôle dans le CP. Une meilleure compréhension de cette résistance permettrait de l’anticiper et ainsi d’augmenter l’efficacité de ces inhibiteurs et de rallonger l’espérance de vie des patients.

4.1.2. Hypothèses de travail

Les connaissances actuelles sur les mécanismes de résistance aux PARPi ainsi que l’avancée de la recherche sur le rôle de l’autophagie en tant qu’acteur dans résistance multidrogue nous ont amené à poser ces deux hypothèses :

1. L’autophagie joue un rôle dans la résistance innée à l’olaparib dans le cancer de la prostate.
2. L’autophagie induite par le traitement à l’olaparib à long terme permet la mise en place d’une résistance acquise à cet inhibiteur.

Une meilleure compréhension de ces deux aspects permettrait non seulement d’augmenter la survie des patients potentiellement résistants ou devenus résistants à l’olaparib mais aussi d’élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour augmenter l’efficacité de ces inhibiteurs.

4.1.3. Objectifs

Nous avons déterminé deux objectifs principaux pour répondre aux hypothèses posées pour ce projet de doctorat.

Le premier objectif, détaillé en premier point dans la partie résultats, est de déterminer s’il existe une corrélation entre les niveaux de base d’autophagie et la sensibilité à l’olaparib des différentes lignées du cancer de la prostate. Si cette corrélation existe, nous allons élucider comment la résistance médiée par l’autophagie fonctionne. Cet objectif pour but de déterminer l’importance de l’autophagie dans la résistance innée.

Le deuxième objectif, présenté en deuxième point de la partie résultats, est de développer une résistance acquise à l'olaparib chez des lignées cellulaires du cancer de la prostate initialement sensible, et une résistante, à l'olaparib afin d'identifier les voies moléculaires affectées lors cette transformation. Cet objectif a pour but de mieux comprendre la résistance acquise et de valider si l'autophagie y joue un rôle.

Chapitre 2 – RÉSULTATS

1. Article #1 : Pre-activation of autophagy impacts olaparib sensitivity in prostate cancer cells.

1.1.1. Résumé en français

Titre en français : La pré-activation de l'autophagie module la sensibilité à l'olaparib dans les cellules du cancer de la prostate.

La poly (ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) joue un rôle essentiel dans la réparation à l'ADN et est ciblée par des thérapies anti-cancéreuses utilisant les inhibiteurs de PARP (PARPi) comme l'olaparib. Les traitements aux PARPi dans le cancer de la prostate (PC) sont présentement utilisés en essais cliniques comme monothérapie ou thérapie combinée avec les traitements standards (hormonothérapie), pour les patients ayant des mutations au niveau des gènes de réponse aux dommages à l'ADN. Malheureusement, 20% de ces patients ne répondent pas à ce nouveau traitement. Ce mécanisme de résistance dans le PC est encore un peu compris. Ici, nous avançons que l'autophagie affecte différemment la réponse à l'olaparib des lignées cellulaires du PC en fonction de son statut d'activation. La pré-activation de l'autophagie avant le traitement à l'olaparib mène à une augmentation de l'activité des mécanismes de réparation à l'ADN par recombinaison homologue (HR) pour réparer les cassures double brin induites par l'olaparib et une augmentation de la prolifération cellulaire. Quand l'autophagie est activée après le traitement à l'olaparib, ou complètement inhibée, les cellules du PC ont une sensibilité plus élevée à cet PARPi. Cette résistance médiée par l'autophagie est en partie régulée par la localisation nucléaire de sequestrosome 1 (SQSTM1/p62). La diminution de cette localisation induite par la pré-activation d'autophagie mène à une augmentation de l'expression protéique de la filamine A (FLNA) et du recrutement de BRCA1/Rad51 impliqué dans la HR. Nos résultats ont révélé que les niveaux de base d'autophagie pourraient en parti déterminer l'efficacité des PARPi.

1.1.2. Version originale publiée dans Communications Biology

Cahuzac, M., et al. (2022). "Pre-activation of autophagy impacts response to olaparib in prostate cancer cells." *Communications Biology* 5(1): 251.

Pre-activation of autophagy impacts response to olaparib in prostate cancer cells

Maxime Cahuzac^{1,2}, Patricia Langlois^{1,2}, Benjamin Péant^{1,2}, Hubert Fleury^{1,2}, Anne-Marie Mes-Masson^{1,2,3} and Fred Saad^{1,2,3}

¹ *Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC, Canada*

² *Institut du cancer de Montréal, Montreal, QC, Canada*

³ *Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada*

Corresponding author:

Anne-Marie Mes-Masson PhD, FCAHS, FRSC

Centre de recherche du CHUM, 900 rue Saint-Denis, Montreal QC H2X 0A9

anne-marie.mes-masson@umontreal.ca

514 890-8000, poste 25496

1.1.2.1. Abstract

Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) plays an essential role in DNA repair and is targeted by anticancer therapies using PARP inhibitors (PARPi) such as olaparib. PARPi treatment in prostate cancer (PC) is currently used as a monotherapy or in combination with standard therapies (hormonotherapy) in clinical trials for patients with DNA damage response mutation. Unfortunately, 20% of these patients did not respond to this new treatment. This resistance mechanism in PC is still not well understood. Here, we report that autophagy affects differently the response of PC cell lines to olaparib depending on its activation status. Pre-activation of autophagy before olaparib resulted in an increase of DNA repair activity by homologous recombination (HR) to repair double-strand breaks induced by olaparib and enhanced cell proliferation. When autophagy was activated after olaparib treatment, or completely inhibited, PC cells demonstrated an increased sensitivity to this PARPi. This autophagy-mediated resistance is, in part, regulated by the nuclear localization of sequestrosome 1 (SQSTM1/p62). Decrease of SQSTM1/p62 nuclear localization due to autophagy pre-activation leads to an increase of filamin A (FLNA) protein expression and BRCA1/Rad51 recruitment involved in the HR pathway. Our results reveal that autophagy basal levels may in part determine amenability to PARPi treatment.

1.1.2.2. INTRODUCTION

Prostate cancer (PC) is the most frequently diagnosed cancer for North American men, with more than 260 000 new cases each year^{1,2}. Early-stage prostate cancer has an excellent prognosis with excellent 5- and 10-year overall survival with local therapy +/- androgen deprivation therapy (ADT). In advanced prostate cancer, especially when patients become resistant to ADT (known as castration resistant prostate cancer or CRPC), the available therapeutic options are non-curative and survival is generally less than 3 years. Therapeutic options include taxane-based chemotherapy and more recently novel hormonal therapies, that directly or indirectly target the androgen receptor (AR), such as abiraterone and enzalutamide. Eventually patients develop resistance to available therapeutic options and succumb to their disease. Ongoing research continues to better understand and develop therapeutic approaches in patients who fail novel hormone therapies. One avenue of intense research in this area is in the use of PARP inhibitors in prostate cancer.

Germline or somatic mutations in DNA damage response (DDR) genes, particularly in homologous recombination (HR)³⁻⁵, are found in up to 30% of metastatic PC cases. These mutations can be targeted with new anticancer therapies using poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) inhibitors (PARPi)⁶⁻⁸ such as olaparib. PARPi inhibit the PARP1/2 enzymes involved in DNA damage repair⁹ and induce a synthetic lethality in cancer cells that have deficiencies in HR-mediated DNA repair, such as breast and ovarian cancers that harbor *BRCA* mutations⁸. Currently, PARPi are under investigation for PC as a monotherapy or as a combination treatment with standard therapies such as hormonotherapy, chemotherapy, and radiotherapy^{10,11}. One of these clinical trials had shown that olaparib treatment in patients with DDR gene mutations who were also treated with abiraterone had an improved progression-free survival compared to men treated with abiraterone alone (13.8 months vs. 8.2 months)^{4,12}. While different mechanisms of resistance to PARPi have been reported for ovarian and breast cancers, as *BRCA1/2* reverse mutation or induction of the senescence phenotype¹³⁻¹⁶, PARPi resistance in PC remains poorly understood. Recently, autophagy has emerged as a mechanism of multidrug resistance for various therapies in PC¹⁷⁻¹⁹ and may be implicated in resistance to PARPi.

Autophagy is a regulated process that recycles proteins and organelles in the cell and maintains cellular homeostasis under stress conditions, such as nutrient deprivation or oxidative stress. Degraded organelles and proteins are encased in a double-membrane structure called the phagophore, which matures into an autophagosome, also called the autophagic vacuole (AV) that fuses with a lysosome to form an autolysosome (AL) to generate amino acids. Sequestrosome 1 (SQSTM1/p62) is one of the proteins that is degraded during the autophagic process. This ubiquitin-binding protein targets other proteins for degradation through autophagy or proteasomal pathways²⁰. Previous studies have shown that SQSTM1/p62 is a mediator that links autophagy to DNA repair, particularly with HR^{21,22}. In addition, SQSTM1/p62 has been used as a marker of autophagy and aberrant levels of SQSTM1/p62 have been associated with PC and cancer progression²³⁻²⁵. Several studies on PC have also reported autophagy as a pro-oncogenic mechanism through the up-regulation of autophagy genes by the AR pathway or C/EBP β ^{26,27}. Importantly, autophagy has been targeted for potential combinatory therapies in PC to bypass resistance to hormone/chemo-therapies²⁸⁻³⁰, and previous studies have described that autophagy could affect the response to PARPi in ovarian and breast cancers^{31,32}. However, the role of autophagy in PARPi resistance in PC is currently unknown. In the present study, we investigated the impact of autophagy on PC cell response to the PARPi olaparib by following the autophagy activation timeline. We show that autophagy must be activated before olaparib treatment for a cytoprotective effect. This is regulated in part by the localization of SQSTM1/p62 in the nucleus and its role in the proteasomal degradation of the filamin A (FLNA), an actin-binding protein that interacts with DDR proteins. Pre-activation of autophagy by rapamycin before olaparib treatment reduces the level of SQSTM1/p62 in the nucleus and increases the capacity of PC cells to repair the DNA damage induced by olaparib. Using CRISPR/Cas9 to generate a knock-out (KO) of the autophagy-related gene *Atg16L1*, we confirm these results and demonstrate that autophagy pre-activation affects olaparib sensitivity of PC cells and may contribute to PARPi resistance.

1.1.2.3. RESULTS

PC cell lines show different profiles of olaparib sensitivity and basal levels of autophagy

To investigate the possible link between autophagy and the response to PARPi in PC, we first determined the IC₅₀ values for olaparib for three PC cell lines: LNCaP and C4-2B are AR-positive, and PC-3 is AR-negative. Based on dose-response curves to olaparib (Fig. 1a), LNCaP and C4-2B are sensitive (0.17 μ M and 0.076 μ M, respectively) and PC-3 is resistant (2.13 μ M) (Fig. 1b and Supplementary Fig. 10a). Next, we examined the PC cell expression of autophagy proteins such as autophagy-related genes (Atg), beclin-1, and light chain-3 (LC3) A/B, I and II (Fig. 1c). We observed that the expression of Atg5 and the lipidated form of LC3 A/B, LC3-II, were higher in olaparib-resistant PC-3. Between olaparib-sensitive cells, LNCaP had lower levels of LC3-II than C4-2B. Based on the expression of LC3-II, which represents active autophagy, PC-3 cells seemed to have a higher basal level of autophagy compared to LNCaP and C4-2B. To confirm this, we transduced our cell lines with the PremoTM Autophagy Tandem Sensor construct containing the LC3-II protein tagged with red and green fluorescence protein (RFP/GFP) (Fig. 1d-e). This system allows us to quantify the autophagic flux (ratio of number of AL to AV) in PC cells due to differences in pH sensitivity between RFP and GFP, and track the progression from AV to AL (disappearance of GFP signal due to acidic pH of AL). Treatments with 1 nM of the autophagy activator rapamycin for 24 hours alone or in combination with 300 nM of the autophagy inhibitor bafilomycin A1 (Baf) were used as controls. For all cell lines, rapamycin treatment significantly increased the number of AL (red puncta) by approximately 1.5 to 2-fold compared to AV (yellow puncta). Combination with Baf decreased this ratio for LNCaP (4.5-fold change), C4-2B (3-fold change), and PC-3 (6-fold change) (Fig. 1e) cells. These results highlighted that PC-3 demonstrated a higher basal level of autophagy compared to LNCaP and C4-2B (AL/AV ratio = 6.2 compared to 2.5 and 2.7, respectively; Fig. 1e). These observations showed a correlation between basal levels of autophagy in PC cells and olaparib resistance.

Complete depletion of autophagy increases sensitivity to olaparib

To determine the role of autophagy levels in olaparib sensitivity, we generated an *Atg16L1* knockout (KO) in LNCaP, C4-2B, and PC-3 cell lines using the CRISPR/Cas9 method. *Atg16L1* is an important protein for the lipidation of LC3 A/B³³. The efficiency of these KO cell lines was confirmed by western blot (Fig. 1f and Supplementary Fig. 10b). Expression of *Atg16L1* was completely abolished and lipidation of LC3 A/B (LC3-II) was blocked in all KO cell lines, even in autophagy induction and inhibition by rapamycin and bafilomycin A1 treatment. Complete depletion of autophagy reduced the olaparib IC₅₀ values to 0.059 μ M ($p=0.036$), 0.009 μ M ($p=0.004$), and 1.5 μ M ($p=0.067$) for LNCaP, C4-2B, and PC-3, respectively (Fig. 1g-h, Table 1). To ensure that PARP1 or PARylation did not affect olaparib sensitivity, we measured basal level protein by western blot and found no differences between WT PC-3 cells and those undergoing autophagy depletion (Supplementary Fig. 1). Thus, autophagy depletion rendered all PC cells more sensitive to olaparib.

Pre-activation of autophagy by rapamycin affects the olaparib response of PC cells

To confirm that a higher level of autophagy mediates a resistant phenotype to olaparib in PC cells, we induced autophagy with rapamycin 24 hours after (denoted as O10R) the start of a 6-day olaparib treatment (Fig. 2a). Rapamycin alone or in combination with olaparib decreased mammalian target of rapamycin complex (mTORC) phosphorylation while increasing LC3-II in all wild-type (WT) cell lines at day 2 and 6 (Fig. 2b-c, Supplementary Fig. 2a-b and 10c respectively). No differences were observed for LC3-II expression in RO10 and O10R conditions indicating similar levels of autophagy activation (Fig. 2b and Supplementary Fig. 2b and 10c). Using the IncuCyte live-cell imaging system, we followed the proliferation of LNCaP, C4-2B, and PC-3 cells, which was significantly increased under RO10 conditions (21% to 50%, $p=0.021$; 19% to 56%, $p=0.0026$; and 38% to 69%, $p=0.041$; respectively) after 6 days of culture compared to olaparib treatment alone (O10) (Fig. 2d). This increase was not observed under O10R conditions. When autophagy was completely abrogated in PC KO *Atg16L1* cell lines, proliferation was not significantly up-regulated in RO10 conditions (LNCaP KO $p=0.35$; C4-2B KO $p=0.085$; and PC-3 KO $p=0.058$). We also rescued the depletion of autophagy by introducing a plasmid coding for

Atg16L1 with a HA-tag in our PC WT and KO Atg16L1 cell lines (Supplementary Fig. 3). Expression of Atg16L1-HA restored autophagy dynamics by the lipidation of LC3-I in LC3-II that was not observed in PC KO cell lines in autophagy induction and inhibition conditions (Supplementary Fig. 3a and Fig. 1f). Expression of Atg16L1-HA had no effects on autophagy in WT cell lines. PC KO-rescue Atg16L1 also harbored a higher cell proliferation when autophagy was pre-activated (RO10) compared to PC KO Atg16L1 (LNCaP, 48% vs. 23%; C4-2B, 39% vs. 19%; and PC-3, 72% vs. 24%) (Supplementary Fig. 3b and Fig. 2d).

We further examined these results by cell cycle analyses after 2 and 6 days of olaparib treatment (Supplementary Fig. 2c-d and Fig. 2e, respectively). In C4-2B cells, after 6 days of O10 treatment, 70% of cells were blocked in S phase compared to 7% of control cells as it was shown in different cell lines in the literature³⁴⁻³⁶. Consequently, we observed a decrease in G1 subpopulation from 83% (control) to 9% (O10). Interestingly, when autophagy was activated after O10 treatment (O10R) a similar result was observed with an accumulation of C4-2B cells in S phase (66%). When autophagy was pre-activated before olaparib treatment (RO10) the proportion of cells in S phase decreased to 15% and led to an increase of cells in G1 and G2/M (47% and 37%, respectively), indicating that C4-2B cells pre-activated by rapamycin were more proliferative. In LNCaP and PC-3 cells, O10 treatment blocked more cells in G2/M phase compared to C4-2B (50% and 44%, respectively, vs. 21%) as it was also shown in the literature¹⁶. We also observed an increase of the sub-G1 phase population in LNCaP and PC-3 cells by approximately 10%. As observed for C4-2B, RO10 treatment increased the G1 phase population compared to O10 (LNCaP: 64% vs. 26%, and PC-3: 43% vs. 28%), whereas O10R did not change this population. Sub-G1 cells were also decreased in RO10. Moreover, when autophagy was completely abrogated in C4-2B KO *Atg16L1* cells, RO10 treatment did not increase the G1 phase population as observed in WT cells and was similar to the O10 condition, which was approximately 15%. In contrast, RO10 increased G1 phase cells for LNCaP KO *Atg16L1* cells but to a lesser degree than LNCaP WT cells ($p=0.03$ vs $p=0.001$). The same result as WT was observed for O10R condition with no significant differences with O10. For PC-3 cells, KO *Atg16L1* cells harbored a different phenotype compared to WT: O10 did not increase the G2/M phase population as observed with WT cells (10% vs. 44%), and RO10 treatment increased the G1 phase population by 1.2-fold. This observation suggest that

autophagy depletion acts differently in PC-3 cells compared to other PC cell lines. Thus, activation of autophagy before olaparib treatment affects the PARPi response of LNCaP, C4-2B, and PC-3 by limiting effect of olaparib on cell proliferation and cycle. Interestingly, this protective effect was abrogated when autophagy is activated after olaparib treatment or when it was abrogated by CRISPR/Cas9 and rescued when autophagy was restored.

Pre-activation of autophagy reduced olaparib-induced DNA double strand break damage by increasing HR efficiency

Since olaparib acts by inducing high DNA damage level which induces cell death, we hypothesized that autophagy supports cell proliferation and cell cycle progression through the upregulation of DNA repair to counteract this effect of PARPi. Therefore, we investigated if autophagy activation by rapamycin affects the formation and resolution of H2A histone family member X (γ -H2AX) foci, which can be used as a marker of DNA damage level³⁷. WT cells in RO10 treatment had lower levels of γ -H2AX foci per cell after 2 days compared to cells in O10 treatment (LNCaP, 17 vs. 35, $p=0.0092$; C4-2B, 15 vs. 20, $p=0.078$; and PC-3, 13 vs. 25, $p=0.049$) (Fig. 3a and Supplementary Fig. 5a). Although the number of foci decreased after 6 days of treatment, and we observed the same difference between RO10 and O10 (Supplementary Fig. 4a). When autophagy was completely abrogated, the number of γ -H2AX was not statistically different between RO10 and O10 conditions for C4-2B and PC-3 KO *Atg16L1* cell lines. LNCaP KO *Atg16L1* cells demonstrated a decrease in γ -H2AX foci that was not as statistically significant as compared to LNCaP WT cells ($p=0.024$ vs. $p=0.0092$) at day 2. In O10R conditions, levels of γ -H2AX foci were similar from O10 conditions for all cell lines (Supplementary Fig. 4b and Supplementary Fig. 5a).

As olaparib sensitivity is often relating to HR-deficiency and olaparib-induced DNA double-strand break repair, we next measured Rad51 and BRCA1 foci in our cell lines to determine if the decrease of γ -H2AX foci was due to an increase in HR activity (Fig. 3b, Supplementary Fig. 4c and Supplementary Fig. 5b). Autophagy pre-activation (RO10) significantly increased the number of Rad51 foci compared to O10 in all WT cell lines (LNCaP $p=0.023$; C4-2B $p=0.045$; and PC-3 $p=0.031$) (Fig. 3b). Similar to γ -H2AX foci, we did not observe a difference between O10 and RO10 in KO *Atg16L1* cells. However, O10R induced lower Rad51 recruitment compared to O10 or RO10

conditions for C4-2B and PC-3 cell lines (Supplementary Fig. 4c and Supplementary Fig. 5b). BRCA1 foci showed a similar pattern to Rad51: PC cells in RO10 conditions had a higher number of BRCA1 foci compared to O10 or O10R. To determine if the RO10-related increase in Rad51-BRCA1 recruitment was representative of DNA repair activity, the function and activity of HR (DR-GFP) and non-homologous end joining (NHEJ) (Ej5-GFP) were independently assessed using a plasmid-based DNA repair GFP reporter assay that allows the quantification of DNA repair by measuring the ligation rate of digested I-SceI ends (Fig. 3c-d and Supplementary Fig. 4d-e). In this assay GFP-positive cells represent a surrogate for HR and NHEJ activity. Activation of autophagy with rapamycin before or after DR-GFP/I-Sce1-mCherry or Ej5-GFP/ I-Sce1-mCherry transfection was denoted as RT and TR, respectively. Our results showed that rapamycin treatment prior to the DNA damage induced by the plasmid (RT) significantly increased GFP-positive cells by 2.5-fold for LNCaP ($p=0.022$) and 1.5-fold for C4-2B ($p=0.0010$) compared to the control, indicating an increase in HR activity (Fig. 3d). This increase was not significant ($p=0.35$) for PC-3. In KO cell lines, an increase in HR activity under RT conditions was not observed. The efficiency of NHEJ appeared to decrease in C4-2B WT and KO cells, whereas no difference in NHEJ was observed in LNCaP and PC-3. Under TR condition, no changes in HR activity were observed for C4-2B, but a slight decrease was observed for LNCaP and PC-3 (Supplementary Fig. 4d-e). Overall, autophagy activation before induction of DNA breaks by olaparib appears to enhance the cell ability to efficiently repair DNA damage using the HR pathway and not NHEJ.

Complete depletion of autophagy regulates HR by reducing Rad51/BRCA1 recruitment on DNA damage sites

To understand the impact of autophagy on PARPi DNA repair response, we characterized the DDR in the WT and KO *Atg16L1* cell lines. Cells were first irradiated with 8 Gy. We followed γ -H2AX foci resolution (Fig. 4a-b and Supplementary Fig. 6a) and Rad51/BRCA1 recruitment after 30 min and 8-, 24- and 48-h after irradiation (Fig. 4c-e and Supplementary Fig. 6b) by immunocytochemistry. C4-2B and PC-3 KO cell lines had an approximately 2-fold higher level of γ -H2AX foci compared to WT after irradiation, with 16.5 foci/ WT cell versus 23 foci/ KO cells and 9.2 versus 19.2, respectively (Fig. 4a-b and Supplementary Fig. 6a). LNCaP KO cells also showed higher levels but were not statistically different from LNCaP WT, at 14 foci/cell versus 20. The number of γ -H2AX

foci decreased over time, indicating that cells could repair their DNA damage. Interestingly, KO cell lines had less Rad51 and BRCA1 recruitment on DNA damage sites after irradiation compared to WT cells (Fig. 4c-e and Supplementary Fig. 6b). This suggests that HR may be deregulated by autophagy depletion. To confirm this, we used our plasmid-based DNA repair reporter assays, DR-GFP and Ej5-GFP as previously (Fig. 4f). Complete depletion of autophagy significantly reduced the efficiency of HR in C4-2B ($p=0.048$) and PC-3 ($p=0.0002$) cell lines. A non-significant decrease ($p=0.50$) was also observed in LNCaP. Rescued of autophagy using Atg16L1-HA plasmid significantly restored the loss of HR efficiency in PC KO *Atg16L1* cell lines (LNCaP KO-rescue, $p=0.0036$; C4-2B KO-rescue, $p=0.02$; and PC-3 KO-rescue, $p=0.0007$) (Supplementary Fig. 7). Interestingly, NHEJ efficiency remained the same, suggesting that PC KO cell lines preferentially used this pathway to repair their DNA breaks. These results suggest that autophagy impacts HR-mediated DNA repair via BRCA1 and Rad51 recruitment.

SQSTM1/p62 mediates autophagy-regulated response to olaparib through expression of FLNA

Since SQSTM1/p62 is considered a key mediator between autophagy and DNA repair^{21,38}, we examined if SQSTM1/p62 contributed to olaparib resistance when autophagy was pre-activated in PC cell lines. As expected, we observed that the PC KO cell lines had higher expression levels of SQSTM1/p62 compared to WT cells (Fig. 2b). Since nuclear localization of SQSTM1/p62 is important in DNA repair^{21,22,38}, we used confocal microscopy to determine and quantify the localization of SQSTM1/p62 in our PC WT and KO cell lines (Fig. 5a-b and Supplementary Fig. 8a-b). Olaparib alone (O10) in C4-2B WT cells induced a significant increase ($p=0.045$) of SQSTM1/p62 puncta in the nucleus (12/cell) compared to control (5/cell) (Fig. 5a-b). In LNCaP and PC-3 WT cells, differences between the control and O10 conditions were not significant (Fig. 5a-b and Supplementary Fig. 8a-b). Interestingly, autophagy pre-activation (RO10) significantly reduced SQSTM1/p62 foci in the nucleus compared to O10 in LNCaP cells (3.58 versus 5.86, $p=0.045$), C4-2B (6.08 versus 11.16, $p=0.013$), and PC-3 (5.96 versus 9.46, $p=0.046$). This decrease was not observed in O10R conditions (Supplementary Fig. 8b). When autophagy was completely depleted in KO cell lines, we did not observe any significant decrease of SQSTM1/p62 in RO10 compared

to O10 conditions (Fig. 5b). As observed for γ -H2AX foci, PC-3 KO cells had a higher number of SQSTM1/p62 foci after olaparib treatment compared to WT (19.8 vs. 10.2). SQSTM1/p62 interacts with and promotes the proteasomal degradation of FLNA protein, which recruits BRCA1 and Rad51 protein at DNA break sites²¹. We determined whether FLNA was important in this autophagy-mediated resistance to olaparib by measuring the nuclear fraction of FLNA and SQSTM1/p62 (Fig. 5c-d and Supplementary Fig. 8c and 10d). RO10 and O10R conditions were compared with O10 as we studied the impact of autophagy pre- and post-activation on FLNA and SQSTM1/p62 nuclear localisation after an olaparib treatment. Under autophagy pre-activation (RO10), FLNA was more highly localized to the nucleus in LNCaP WT (2.3-fold change), C4-2B WT (3.7-fold change) and PC-3 WT (3.4-fold change) compared to O10 (Fig. 5c-d), which correlates well with increased Rad51/BRCA1 foci. In contrast, O10R conditions or KO cell lines did not show this increase in FLNA expression under RO10 conditions. This increase of FLNA was accompanied by a decrease of SQSTM1/p62 in the nucleus in LNCaP WT (3.3-fold change), C4-2B WT (3.4-fold change) and PC-3 WT (4.5-fold change) in RO10 conditions compared to O10 (Fig. 5c and e). This effect was not observed in O10R condition and in PC KO Atg16L1 cell lines. These results suggest that a variation in SQSTM1/p62 nuclear localization can affect the levels of nuclear FLNA which in turn may affect BRCA1/Rad51 recruitment during HR-mediated DNA repair.

Targeting SQSTM1/p62 rescued effect of autophagy in PC KO Atg16L1 cell lines

To confirm the importance of SQSTM1/p62 in this autophagy-mediated resistance, we used a siRNA against SQSTM1/p62 in our PC KO Atg16L1 cell lines and in WT ones (Fig. 6 and Supplementary Fig. 9). We followed the sequence of treatment as rapamycin, by transfecting siRNA (si) or scramble (Sble) 24 hours before or after olaparib treatment (Sble/siO10, O10Sble/si; respectively) (Supplementary Fig. 9a). We confirmed siRNA efficacy by western blot and observed an important decrease of SQSTM1/p62 protein level mainly in PC KO Atg16L1 but also in PC WT cell lines at day 2 and 6 (Fig. 6a and Supplementary Fig. 10e). Interestingly, pre-inhibition of SQSTM1/p62 (siO10) in LNCaP, C4-2B and PC-3 KO reverses effects of autophagy depletion on cell proliferation after olaparib treatment (15% to 37%, 16% to 52% and 12% to 38%, respectively), where no differences was previously observed in RO10 conditions (Fig. 6b and 2d). A decrease of SQSTM1/p62 had a similar effect as autophagy pre-activation by rapamycin (RO10),

an increase of cell proliferation compared to O10 by 1.7 to 2-fold change for WT cell lines. This phenotype was lost when inhibition of SQSTM1/p62 was performed after olaparib treatment (O10si). No significant differences were also observed in SbleO10 and O10Sble conditions (Supplementary Fig. 9b). Pre-inhibition of SQSTM1/p62 in KO Atg16L1 cell lines also decreased the number of γ -H2AX foci per cell after 2 days compared to cells in O10 treatment (LNCaP KO, 8 vs. 22, $p=0.008$; C4-2B KO, 10 vs. 21, $p=0.027$; and PC-3 KO, 11 vs. 18, $p=0.008$) (Fig. 6c). A similar decrease was observed in WT cells. In all Sble and O10si conditions, levels of γ -H2AX foci were similar from O10 conditions for all cell lines (Supplementary Fig. 9c). To determine if this decrease in γ -H2AX foci was due to an increase of HR efficiency, we used our GFP reporter assay (Fig. 6d). As expected, HR was more efficient in KO Atg16L1 and WT PC cell lines where SQSTM1/p62 was pre-inhibited (siO10) and not O10si conditions compared to SbleO10 and O10Sble, respectively. This provides evidence that the regulation of SQSTM1/p62 drives the autophagy-mediated resistance observed when autophagy was pre-activated in PC WT cell lines.

1.1.2.4. DISCUSSION

Autophagy is considered as a mechanism of multidrug resistance in neuroblastoma and PC and has been targeted to increase the efficiency of PARPi and chemotherapies, respectively^{28,39-41}. However, the role of autophagy in PARPi resistance remains poorly understood in PC. Here, we propose that pre-activation of autophagy before olaparib treatment provided a cytoprotective effect in PC cells that supported proliferation and DNA repair and may provide insights into mechanisms of PARPi resistance (Fig. 6e). When autophagy is pre-activated (higher basal level) before olaparib treatment, nuclear localization of SQSTM1/p62 is reduced leading to higher expression of FLNA by limiting its proteasomal degradation. This permits cells to have a more efficient HR and that could contribute to a resistant phenotype to olaparib. If autophagy is activated after treatment or completely inhibited, FLNA expression is decreased by SQSTM1/p62 levels, HR is less functional and PC cells are sensitized to olaparib.

Several studies have focused on the effect of autophagy depletion to increase the efficiency of conventional treatments (hormono- and chemotherapies) in PC^{19,28,29,42}. We observed a similar effect in which autophagy depletion significantly increased PC sensitivity to olaparib and showed that the basal activation level of autophagy impacts this sensitivity. PC-3 cells had higher basal levels of autophagy than the other PC cell lines and were more resistant to olaparib. This higher basal level of autophagy is consistent with reports that describe autophagy enhances prostate tumor growth²⁶.

In our study we decided to investigate whether the sequencing of autophagy activation with rapamycin before or after Olaparib treatment would affect PARPi response. When autophagy was activated after olaparib treatment (O10R), we observed a slight decrease in cell proliferation (Fig. 2d). This result was not surprising because it was shown in the literature that rapamycin and olaparib co-treatment reduced cell proliferation, invasion and tumor progression in lung and prostate cancers⁴³⁻⁴⁵. However, when autophagy is activated by rapamycin prior to olaparib treatment (RO10), autophagy protects PC WT or PC KO-rescue Atg16L1 cells against this PARPi

and not PC KO *Atg16L1* ones. These results indicate the importance of the basal level of autophagy and the timing of its activation on the PARPi response.

Autophagy is involved in the DNA repair of double strand breaks by acting on KAP1 (KRAB (Kruppel-Associated Box Domain)-Associated Protein 1)/STAT3 or SQSTM1/p62 pathways, which regulate HR by interacting with BRCA1/2 and FLNA, respectively^{21,46}. Here, we focused mainly on SQSTM1/p62 because of its accumulation in our KO PC cell line models. Autophagy pre-activation by rapamycin leads to increased HR activity and resolved more efficiently γ -H2AX foci. We observed this pattern in all three cell lines at different levels that likely reflected differences in their AR expression, autophagy basal levels, DNA repair efficiency or even the different degrees of autophagy activation by rapamycin⁴⁷⁻⁴⁹. Interestingly, we observed a similar level of γ -H2AX foci after 2 and 6 days of treatment between WT and KO cell lines despite the decreased HR efficiency with autophagy depletion. We highlighted that PC KO cell lines repaired DNA breaks using the NHEJ system instead of HR (Fig. 4 and Supplementary Fig. 6), which would explain how γ -H2AX foci were resolved or decreased even during low Rad51 and BRCA1 recruitment and complete depletion of autophagy. Alternatively, autophagy may also affect pathways other than DNA repair. Autophagy may affect olaparib availability after it enters in the cell as drugs can be trapped in lysosomes and undergo degradation during the autophagy process or exocytosis, depending on their basic pKa » 8 or the expression of P-glycoprotein 1 (P-gp1) at the surface of lysosomes⁵⁰⁻⁵³. Because olaparib has a basic pKa = 0.2, P-gp1 may reduce the PARPi availability in cells and permit olaparib accumulation in lysosomes, leading to its degradation.

Autophagy has been considered an ideal target to increase treatment efficacy in various cancers. In PC, seven clinical trials have used an autophagy inhibitor in combination with hormono- or chemotherapies but most have not demonstrated efficacy^{54,55}. Our results suggest that the autophagy basal level in cancer cells and/or timing of sequential treatment may impact treatment outcomes and efficacy. Moreover, measuring the basal autophagy level of patient tumors/tissues in ex vivo tumor models by using a combination of autophagy markers as SQSTM1/p62 and Atgs may help determine a patient's response to PARPi^{56,57}.

In summary, this study reveals that autophagy can contribute to the PC cell response to olaparib by regulating SQSTM1/p62 nuclear localization and DNA repair efficiency and provides a potential mechanism of PARPi resistance. Evaluating autophagy basal levels in patient tissues may help determine which patients will be responsive or amenable to PARPi therapy and provides considerations in improving the efficacy of combination therapies in PC using autophagy inhibitors, particularly their sequence/timing in their treatment course when combined with PARPi therapy.

1.1.2.5. METHODS

Cell culture

Human PC cell lines, LNCaP and PC-3, were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC CRL-174, ATCC CRL-250, respectively). C4-2B cells were gifted by Dr. Gleave (Vancouver Prostate Centre). All cell lines were maintained in RPMI 1640 (Wisent Inc., 350-000-EL) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 0.5 ug/mL amphotericin B (Wisent Inc., 450-105-QL), and 50 ug/mL gentamicin (Life Technologies Inc., 15710064). All PC cell lines were authenticated in 2019 using short tandem repeat (STR) profiling by the McGill University Genome Center (Montreal, Canada). All cell lines were tested negative for mycoplasma with IDEXX BioAnalytics (Columbia, MO65201). To generate KO *Atg16L1* for each cell line, the CRISPR/Cas9 method was used to target exon 1. Cells were transfected using Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientific, L3000-015) with two RNA guides against the *Atg16L1* sequence (5' AAACCCGCTGGAAGCGCCACATCTC 3') gifted by Dr. Russel (University of Ottawa, ON, Canada). Selection with puromycin (Invitrogen, ant-pr-1) was used 48 hours after transfection and was maintained for at least 2 weeks. Limiting dilutions were performed for clonal selection. KO *Atg16L1* cell lines were verified by western blot and short tandem repeat (STR) DNA profiling was performed. Rescue experiment was performed using a plasmid coding for Atg16L1 with a HA-tag gifted by Dr. Russel. siRNA against SQSTM1/p62 were purchased from Horizon Discovery (J-010230-05-0020 and J-010230-07-0020).

Reagents and antibodies

Olaparib (Selleckchem, AZD2281), rapamycin (LKT Labs, 53123-88-9), and bafilomycin (Sigma-Aldrich, 88899-55-2) were used. The following antibodies were used for the study: Beta-Actin (AC14) (abcam, AB6276, 1:20000 dilution); Atg16L1 (D6D5) (Cell Signaling, 8089T, 1:1000 dilution); Atg5 (D5F5U) (Cell Signaling, 12994S, 1:1000 dilution); Atg12 (D88H11) (Cell Signaling, 4180S, 1:1000 dilution); Beclin-1 (D40C5) (Cell Signaling, 3495S, 1:1000 dilution); Atg7 (D12B11) (Cell Signaling, 8558S, 1:1000 dilution); β -Tubulin (D2N5G) (Cell Signaling, 15115S, 1:1000 dilution); Filamin A (Cell Signaling, 4762S, 1:1000 dilution); SP1 (Sigma, PLA0307, 1:5000 dilution); anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) (Sigma-Aldrich, JBW301, 1:2000 dilution); LC3 A/B (D3U4C)

(Cell Signaling, 12741S, 1:750 dilution); phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) (Cell Signaling, 5536T, 1:1000 dilution); SQSTM1/p62 (Cell Signaling, 5114T, 1:1000 dilution) and (abcam, ab56416, 1:100 dilution); Rad51 (114B4) (abcam, ab213, 1:750 dilution) and BRCA1 (Sigma Millipore, 07-434, 1:1000 dilution), PARP1 (proteintech, 66250, 1:650 dilution) and PAR/pADR (R&D systems, 4335-MC-100, 1:1000 dilution).

Drug treatment and X-ray radiation

Cells were treated with 10 μ M olaparib 24 hours before or after 1 nM rapamycin treatment. Bafilomycin A1 at 300 nM for 6 hours was used to inhibit autophagy. DNA damage was induced by 8 Gy gamma-irradiation.

Clonogenic Assays

Cells were seeded at 500 cells/well for C4-2B and PC-3 and 1,000 cells/well for LNCaP in 6-well plates and allowed to adhere for 24 hours in 5% CO₂ at 37°C. Medium was removed and replaced with RPMI complete medium containing olaparib (0.05 μ M to 20 μ M) After 7 days of treatment, cells were fixed with methanol and stained with a solution of 50% v/v methanol and 0.5% m/v blue methylene (Sigma-Aldrich Inc.). Colonies were counted under a stereomicroscope and reported as a percentage of the control. IC₅₀ values were determined by using Graph Pad Prism 8 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Each experiment was performed in duplicate and repeated three times.

Protein preparation and western blot analysis

Proteins were extracted from cell lines using mammalian protein extraction reagent (MPER; 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 0.25% Triton 100X, and 10% glycerol) containing a protease and phosphatase inhibitor cocktail (ThermoFisher Scientific, PIA32961). Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, 500-0006). Twenty micrograms of total protein extract were separated in precast 4-15% gradient Tris-glycine SDS-polyacrylamide gels (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, Bio-Rad, 456-1086) and transferred onto Trans-Blot Turbo Mini 0.2 μ m nitrocellulose membranes (Bio-Rad, 170-4159). Membranes were blocked with 5% milk in PBS-Tween for 1 hour and probed with primary antibodies overnight at 4°C with agitation. Primary antibodies were detected with peroxidase-conjugated secondary antibodies Goat anti-

mouse (Millipore, AP124P, 1:4000 dilution), Goat anti-rabbit (Millipore, AP156P, 1:10000 dilution) and Rabbit anti-goat (Millipore, AP106P, 1/4000 dilution) and enhanced with chemiluminescence (Millipore, RPN2232) detected using the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Actin was used as a loading protein control. Each experiment was repeated three times. Image J was used to quantify western blot.

Measurement of autophagic flux

Cells were seeded onto coverslips at 15,000 cells/well for C4-2B and PC-3 and 25,000 cells/well for LNCaP in 24-well plates. After 24 hours, cells were transfected with the Premo Autophagy Tandem Sensor RFP-GFP-LC3B BacMam 2.0 Expression vector (Thermo Fisher, P36239) according to manufacturer's protocol and were then used for experiments as described. Cells were fixed with formalin for 15 minutes at room temperature, washed using PBS, and coverslips were mounted onto slides using Prolong Gold® anti-fade reagent with DAPI (Life Technologies Inc., 14209S). Three different confocal images per condition were obtained on a Leica TCS-SP5 inverted microscope using a HCX PL APO CS 63x/1.4 Oil UV objective. Excitation was performed using a 405 diode laser for DAPI, a 488nm line of an Argon laser for GFP and a 561nm DPSS laser for RFP using a sequential acquisition at 400Hz scan speed. Detection bandwidth was 415-478nm for DAPI using a PMT, 498-551nm for GFP using a HyD under the Standard mode and 5561-677nm for RFP using a HyD under the Standard mode. Images were acquired with the Las-AF software. Final images are 8bits, 2048x2048 (axial pixel size of 120nm). Z-stacks were performed to generate a maximum intensity projection (MIP) for a representative sampling of the thickness of each cell (10 z sections). Images were analyzed using FIJI software (NIH) with a macro, adapted from Daniel J. Shiwarski (creator, B.S., University of Pittsburgh). A mean of 20 cells per condition was quantified. Each condition was performed in triplicate and repeated three times.

Cell cycle analysis

Cells were seeded in 6-well plates and treated with rapamycin 24 hours prior to olaparib treatment. Cells were fixed in 70% ethanol and incubated with 100 µg/mL RNase A and 25 µg/mL propidium iodide (PI). A maximum of 30,000 events was counted per condition using the Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software.

Immunocytochemistry

A total of 8,000 to 20,000 cells were seeded onto coverslips in 12-well plates and grown for different time points (8 and 16 hours and 1, 2, and 6 days). Cells were fixed with formalin for 15 minutes at RT. Slides were blocked for 1 hour at room temperature in PBS containing 1% BSA, 4% donkey serum, for SQSTM1/p62 and H2AX proteins, and 1% BSA, 20% FBS for Rad51/BRCA1. Coverslips were incubated with primary antibodies diluted in the same blocking buffer overnight at 4°C. Cells were washed with PBS and incubated with appropriate secondary antibodies for 1 hour at RT, anti-mouse Cy5 (Life Technologies Inc., A10524, 1:800 dilution) and anti-rabbit 488 (ThermoFisher Scientific, A-11008, 1:500 dilution). Coverslips were mounted onto slides using Prolong Gold® anti-fade reagent with DAPI (Life Technologies Inc., P36935). For Rad51-BRCA1 and H2AX proteins, images (40X and 20X magnification, respectively) were obtained using a Zeiss microscope (Carl Zeiss, Zeiss AxioObserver Z1,). AxioVision™ software (Carl Zeiss) was used to calculate the average number of foci per nucleus. For SQSTM1/p62 protein, confocal images were acquired on a Leica TCS-SP5 inverted microscope using a HCX PL APO CS 63x/1.4 Oil UV objective. Excitation was performed using a 405 diode laser for DAPI, and a 633nm HeNe laser using a sequential acquisition at 400Hz scan speed. Detection bandwidth was 415-478nm for DAPI using a PMT and 643-750nm using a HyD under the Standard mode. Images were acquired with the Las-AF software. Final images are 8bits, 1024x1024 with a zoom factor 2 (axial pixel size of 120nm). Z-stacks were performed to generate a maximum intensity projection (MIP) for a representative sampling of the thickness of each cell (6 to 8 z sections). Images were analyzed using FIJI software (NIH) and Imaris software (Oxford Instruments).

IncuCyte phase-contrast live-cell imaging assay

Cells were seeded at 1,000 cells/well for C4-2B and PC-3 and 1,500 cells/well for LNCaP in 96-well plates. Cells were incubated with 1 nM rapamycin for 24 hours before or after the start of a 6 day 10 µM olaparib treatment. Cell numbers to monitor proliferation were imaged by phase-contrast using the IncuCyte™ Live-Cell Imaging System (IncuCyte HD) at 2-hour intervals from two separate regions. Each experiment was performed in triplicate and repeated three times.

Analysis of HR and NHEJ activity

HR and NHEJ activities were measured using the reporter plasmids pcDNA-GFP HR and pcDNA-GFP NHEJ, a gift from Dr. Jean-Yves Masson (Université de Laval, QC, Canada). One million cells of C4-2B, PC-3, and LNCaP were transfected using Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientific) with the reporter plasmid and pCMV-I-SceI vector containing an mCherry-tag. After 48 hours, cells were collected, and the number of GFP-positive and mCherry-positive cells was determined by Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). Quantification of GFP-positive cells (Q2) and GFP-positive + mCherry-positive cells (Q3) was achieved using Flowjo software. HR and NHEJ efficiency were determined following this equation: $(1) \frac{Q2}{Q2+Q3}$.

Isolation of nuclear and cytoplasmic extract

Nuclear extraction was prepared using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (ThermoFisher Scientific Scientific, 78833) according to manufacturer's instructions. Briefly, treated cells were washed to PBS 1X and centrifuged at 1000 x g for 5 minutes. The cell pellet was suspended into 35 µL of cytoplasmic reagent I by vortexing and incubated on ice. After 10 minutes incubation 1.9 µL of cytoplasmic reagent II was added, tubes were vortexed and incubated for 1 minute on ice. Cytoplasmic extract was isolated by 5 minutes centrifugation at 16 000 x g and transferred to a pre-chilled tube. To remove all cytoplasmic content, the insoluble pellet fraction was washed 3 times with ice-cold PBS 1X and centrifuged as previously. This pellet was next resuspended in 18 µL of nuclear extraction reagent by vortexing 20 seconds every 10 minutes, for a total of 40 minutes. Tubes were stocked at -80°C until their centrifugation at 16 000 x g for 10 minutes before western blotting. Cytoplasmic and nuclear fractions for each cell lines were loaded in the same gel to ensure purity of nuclear fraction. Image J was used for quantification.

Statistics and Reproducibility

Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 8 (GraphPad Software Inc.) by the two-tail Student t-test, which was justified appropriately for every experimental design. The data were normally distributed and the variance between groups that were statistically compared was similar. A *p-value* of less than 0.05 was considered statistically significant. For all data, the mean ± SEM of three independent experiments is shown.

1.1.2.6. ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge Dr. Saad and Dre. Mes-Masson laboratory members for comments and discussion. We thank Dr. Gleave (Vancouver Prostate Centre) for C4-2B cell line, Dr. Russel (University of Ottawa) for CRISPR guide RNA against Atg16L1 and for Atg16L1-HA plasmid and Dr. Yves-Masson (Centre de recherche du CHU de Québec-Université de Laval) for pCMV-I-SceI, pcDNA-GFP HR/NHEJ. We also thank Dre. Cleret-Buhot from CRCHUM live imaging platform for her expertise, Jacqueline Chung for manuscript editing and the Institut du cancer de Montréal (ICM). This work was supported by Raymond Garneau Chair in Prostate Cancer Research of the Université de Montréal (F.S.), research grants from the Canadian Urological Association and Canderel/ICM and. Département de biologie moléculaire de l'Université de Montréal.

1.1.2.7. COMPETING INTERESTS

F.S. is an advisory board member (personal) and has received research funding (institutional) from AstraZeneca, Pfizer, Astellas, Bayer and Janssen.

1.1.2.8. AUTHOR CONTRIBUTION STATEMENT

M.C., B.P., H.F., A.M.M.M., and F.S. conceived and designed the experiments. M.C. and P.L., conducted the experiments. B.P., A.M.M.M., and F.S. supervised the project. M.C., B.P., H.F., A. M.M.M., and F.S. wrote the paper.

1.1.2.9. FIGURES

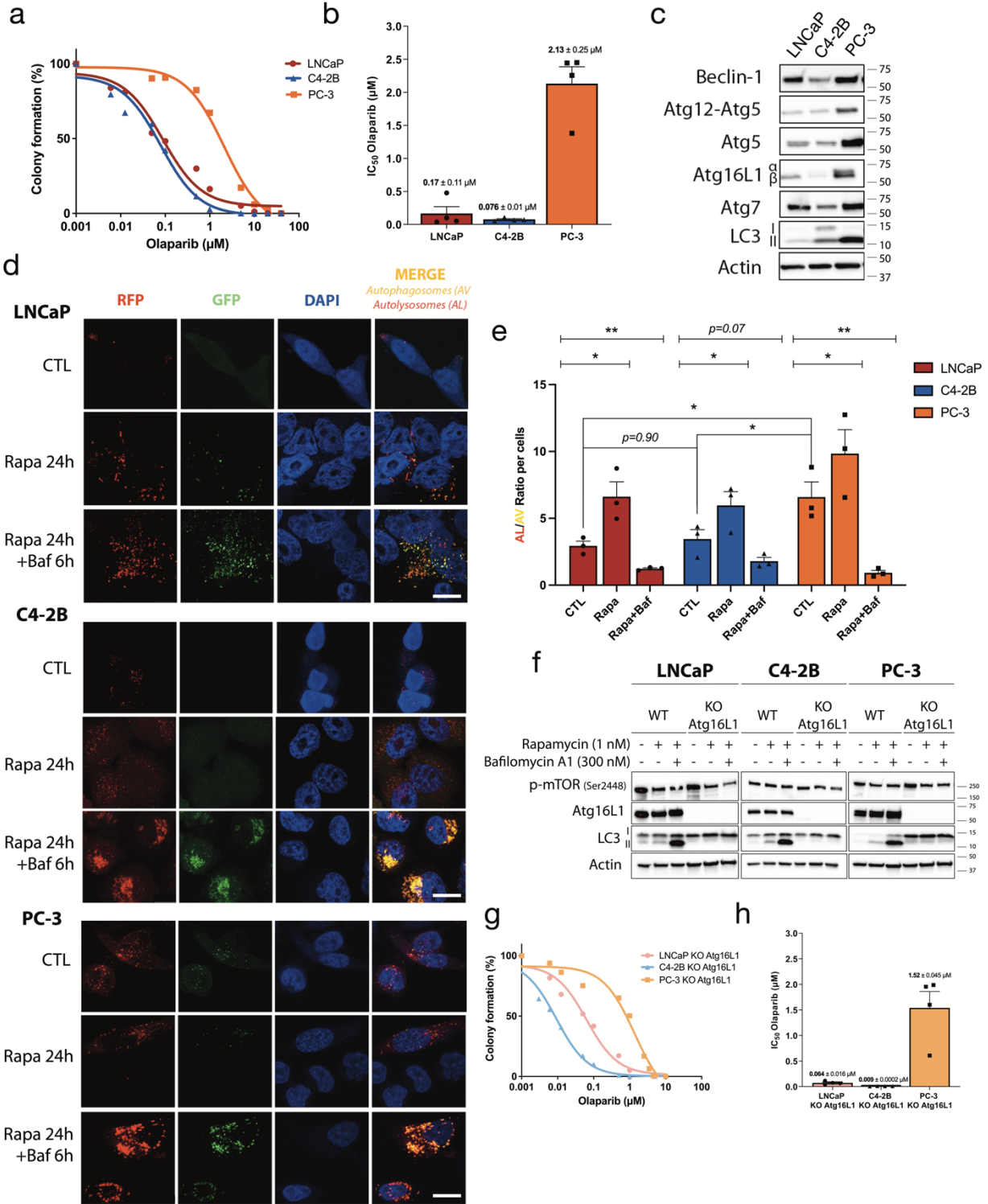


Figure 1: Basal level of autophagy affects olaparib sensitivity profile of PC cell lines. **(a)** Olaparib sensitivity curves in PC cell lines determined by clonogenic assay. **(b)** Olaparib IC_{50} of PC cell lines

calculated from (a). (c). Western blot analysis of basal level expression of key autophagy proteins in PC cell lines. (d). Representative images of autophagy flux with the tandem RFP-GFP LC3B sensor in cell lines, captured by confocal microscopy. Rapamycin (Rapa; 1 nM) was used as positive control and combined with 300 nM Bafilomycin A1 (Baf) as a negative control. (e). Quantification of autophagy flux was achieved with a specific macro for Image J to calculate the ratio between autolysosomes (AL; red puncta) and autophagosomes (AV, yellow puncta) relative to control. (f). Confirmation of KO *Atg16L1* in PC cell lines under control, autophagy-induced and autophagy-blocked conditions by western blot analysis. (g). Olaparib sensitivity curves in KO *Atg16L1* cell lines determined by clonogenic assay. (h). Olaparib IC₅₀ of KO *Atg16L1* cell lines calculated from (g). Bars represent average \pm SEM of IC₅₀ values obtained by three independent clonogenic assays for (b) and (h). The mean \pm SEM of four (b and h) or three (e) independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tail Student t-test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Scale bar 10 μm .

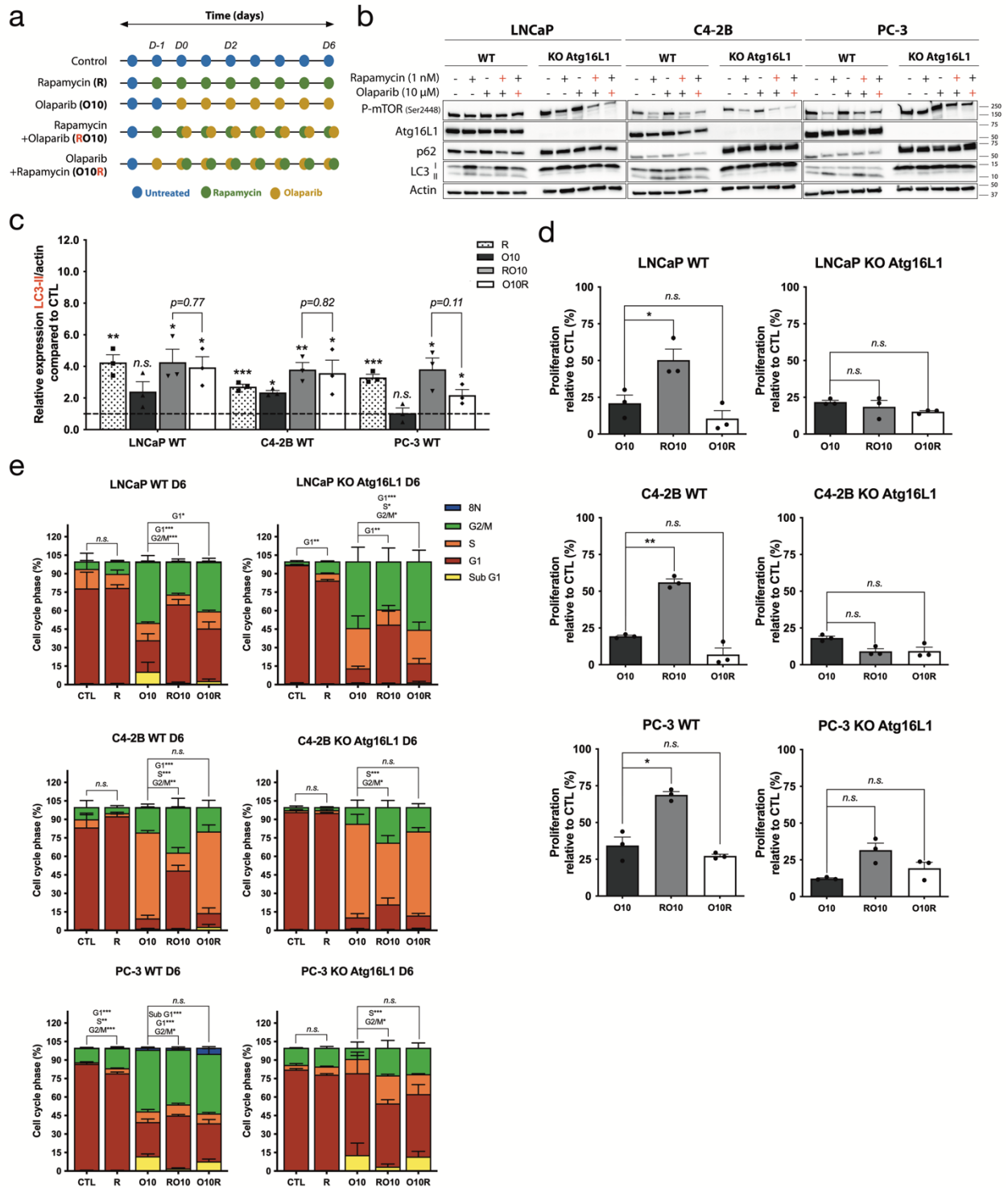


Figure 2: Pre-activation of autophagy by rapamycin induces a protective effect against olaparib. (a). Treatment timeline of cell lines. Cells were treated with 10 μM olaparib alone (denoted as O10) or received 1 nM rapamycin 24 hours before (RO10) or 24 hours after (O10R) the start of olaparib treatment. Experiments were conducted for 6 days. (b). Western blot analyses of

autophagy induction after olaparib and rapamycin treatments in WT and KO *Atg16L1* cell lines at day 2. Rapamycin (+) denotes RO10. Olaparib (+) denotes O10R. (c). Relative expression of LC3-II normalized with actin and compared to control (CTL) from (b). (d). Cell proliferation of WT and KO cell lines under O10, RO10 or O10R treatments at day 6. (e). Quantification of cell cycle phase populations determined by flow cytometry following 6 days of treatment of WT and KO cell lines. For all data, the mean \pm SEM of three independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tail Student t-test. n.s. = non-significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

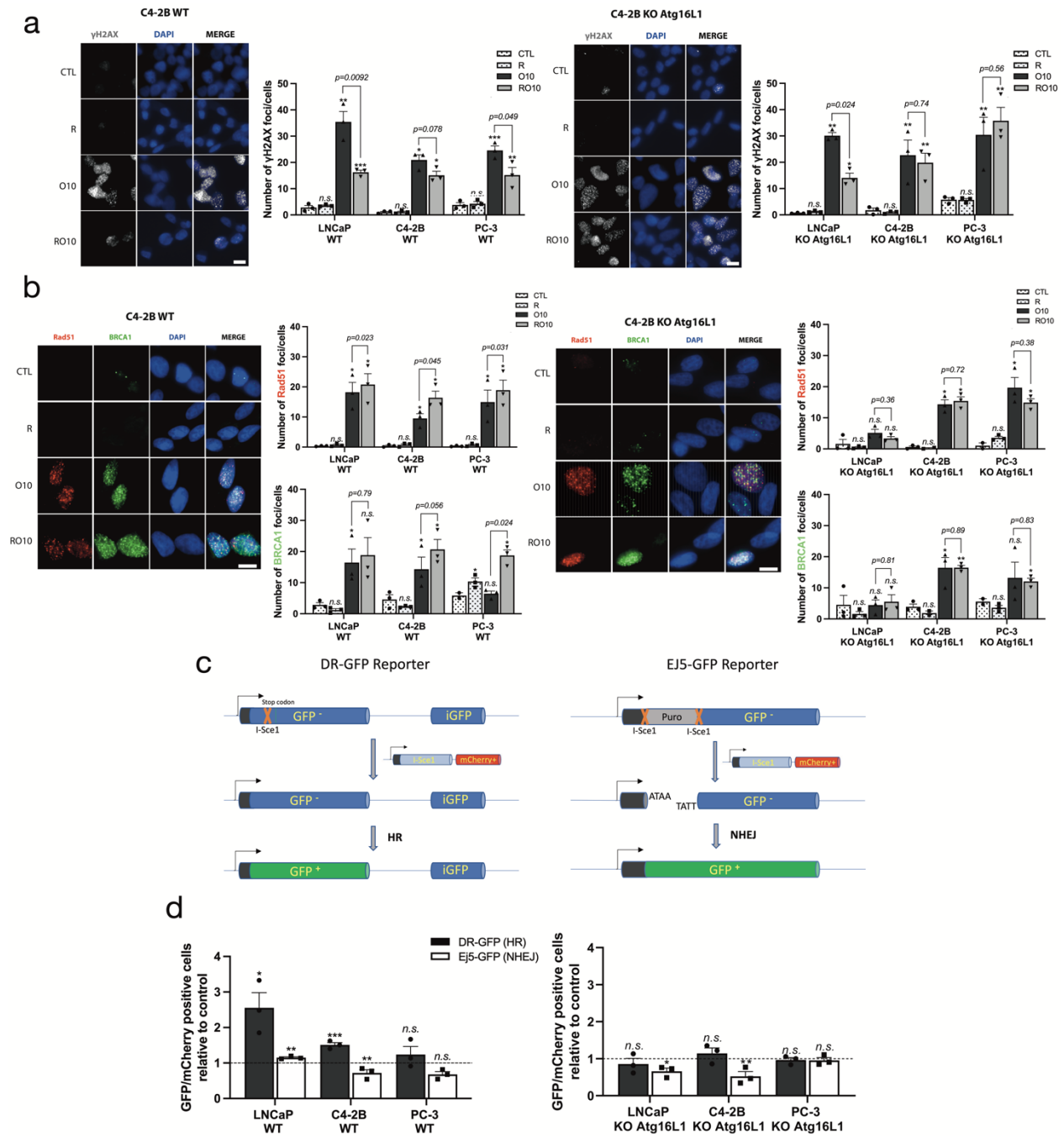


Figure 3: Pre-activation of autophagy increases HR activity and reduces accumulation of DNA damage induced by olaparib. **(a).** Representative images (C4-2B WT and KO *Atg16L1*) and quantification of the number of γ -H2AX foci per nucleus in PC WT and KO cell lines following treatment with rapamycin alone (R), O10 or RO10 after 2 days. **(b).** Representative images (C4-2B WT and KO *Atg16L1*) and quantification of Rad51 and BRCA1 foci following same conditions as (a). **(c).** Schematic representation of reporter assay system. **(d).** Quantification of HR (DR-GFP) and

NHEJ (Ej5-GFP) activity when autophagy was activated by rapamycin 24 hours before plasmids co-transfection (RT). The ratio of GFP-positive cells versus mCherry-positive cells was determined by flow cytometry. For all data, the mean \pm SEM of three independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tail Student t test. n.s. = non-significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. Scale bar 10 μm .

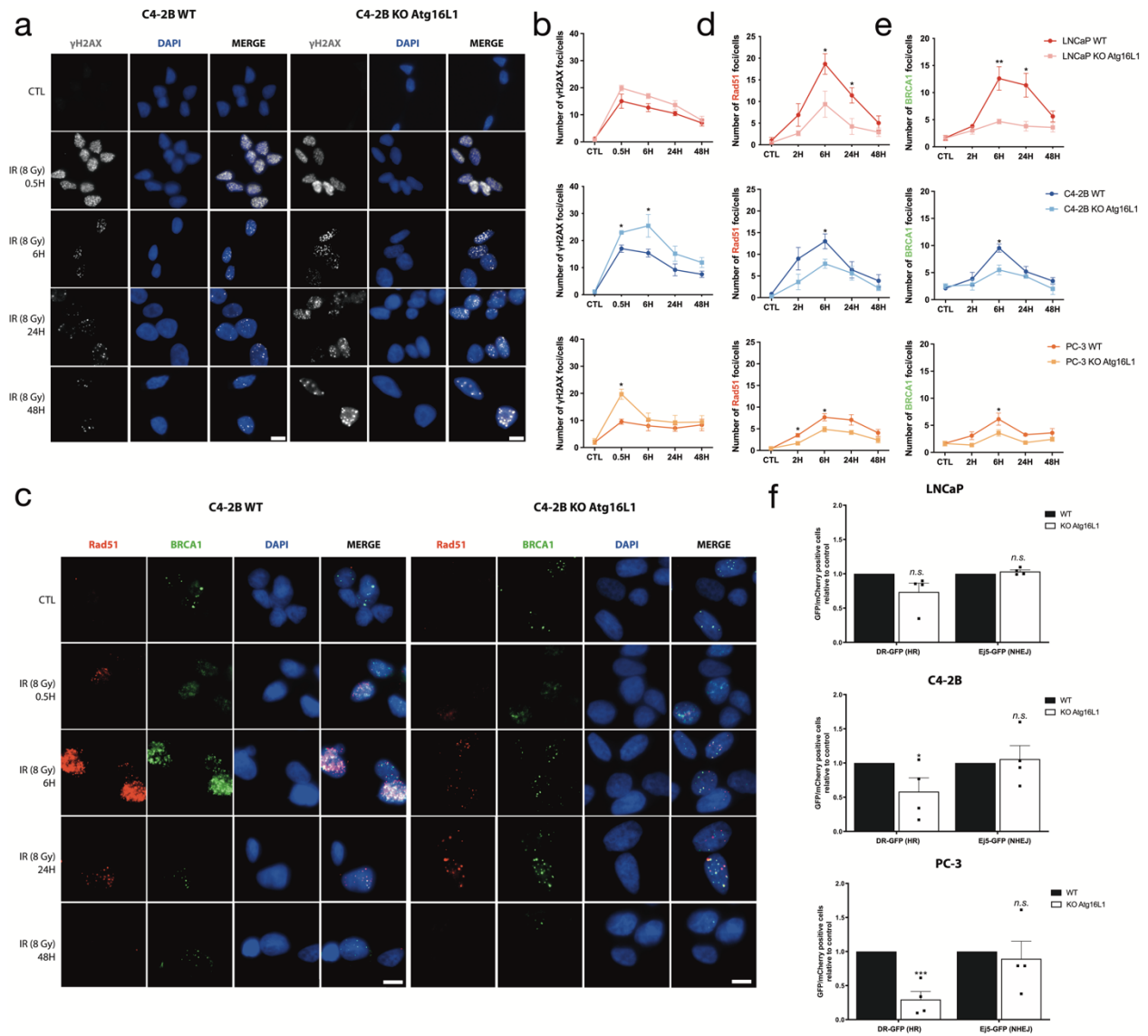


Figure 4: Autophagy-depleted PC cells repair DNA breaks using NHEJ. **(a)**. Representative images of the number of γ -H2AX foci per nucleus in WT and KO cells of C4-2B after 8 Gy irradiation. **(b)**. Quantification of γ -H2AX foci per cells. **(c)**. Representative images of the number of Rad51 and BRCA1 foci per nucleus in WT and KO cells of C4-2B after 8 Gy irradiation. **(d-e)**. Quantification of Rad51 and BRCA1 foci per cell. **(f)**. Analysis of HR (DR-GFP) and NHEJ (Ej5-GFP) activity in WT and KO cell lines by flow cytometry. The mean \pm SEM of three (b) or four (d-e) independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tail Student t test. n.s. = non-significant. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Scale bar 10 μ m.

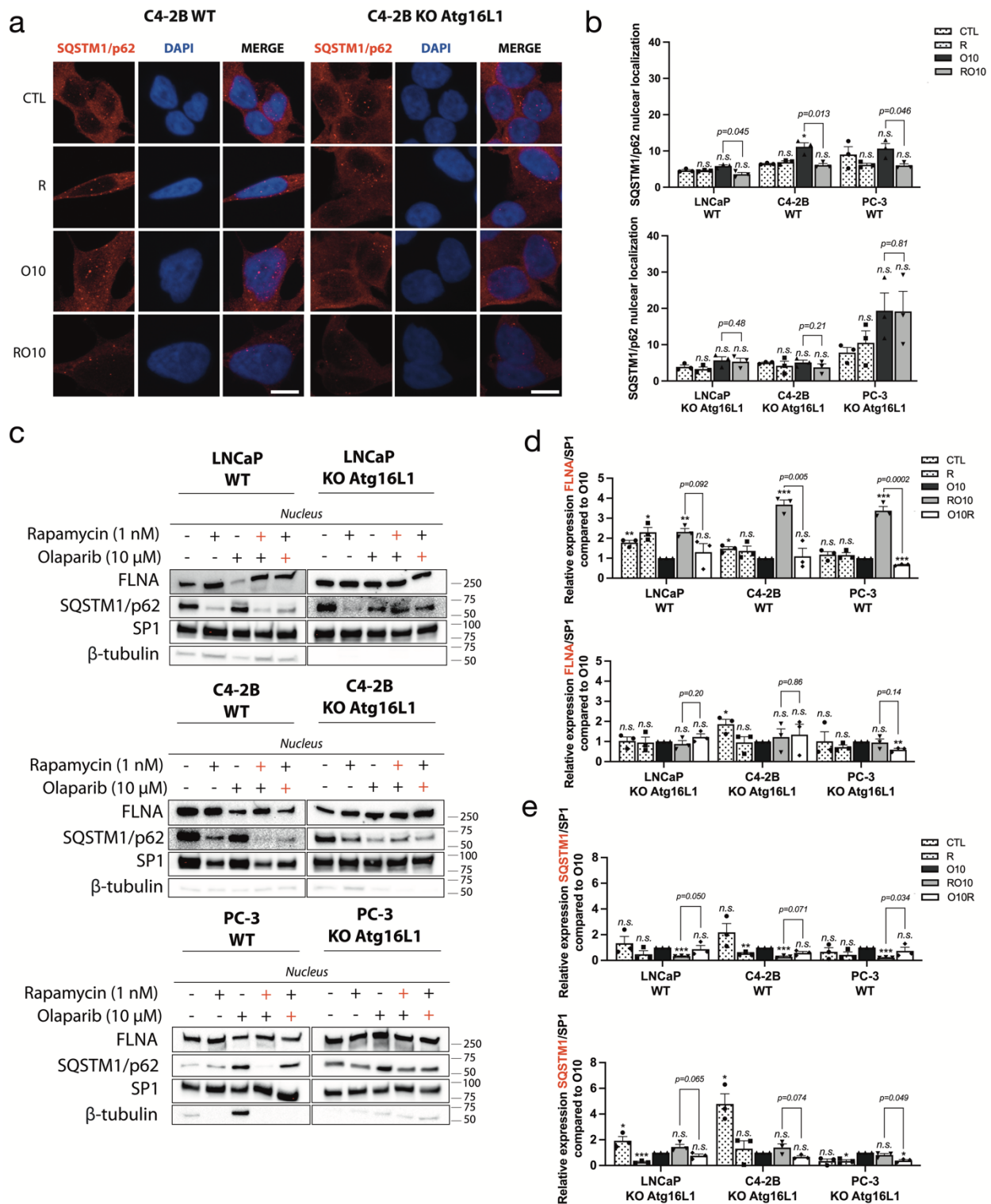


Figure 5: SQSTM1/p62 nuclear localization regulates autophagy-mediated resistance to olaparib. (a). Representative images of the number of SQSTM1/p62 puncta in C4-2B WT and KO cell lines following rapamycin alone (R), O10 or RO10 treatments after 2 days. (b). Quantification of nuclear

SQSTM1/p62 in WT and KO cell lines. (c). Western blot of nuclear fraction after 2 days of RO10 and O10R treatment in PC WT and KO *Atg16L1* cell lines. Rapamycin (red +) denotes RO10. Olaparib (red +) denotes O10R. β -tubulin was used as quality control as marker of cytoplasmic fraction and SP1 as a marker of nuclear fraction. (d-e). Relative expression of FLNA and SQSTM1 normalized with SP1 and compared to O10 condition. For all data, the mean \pm SEM of three independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tail Student t test. n.s. = non-significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. Scale bar 10 μm .

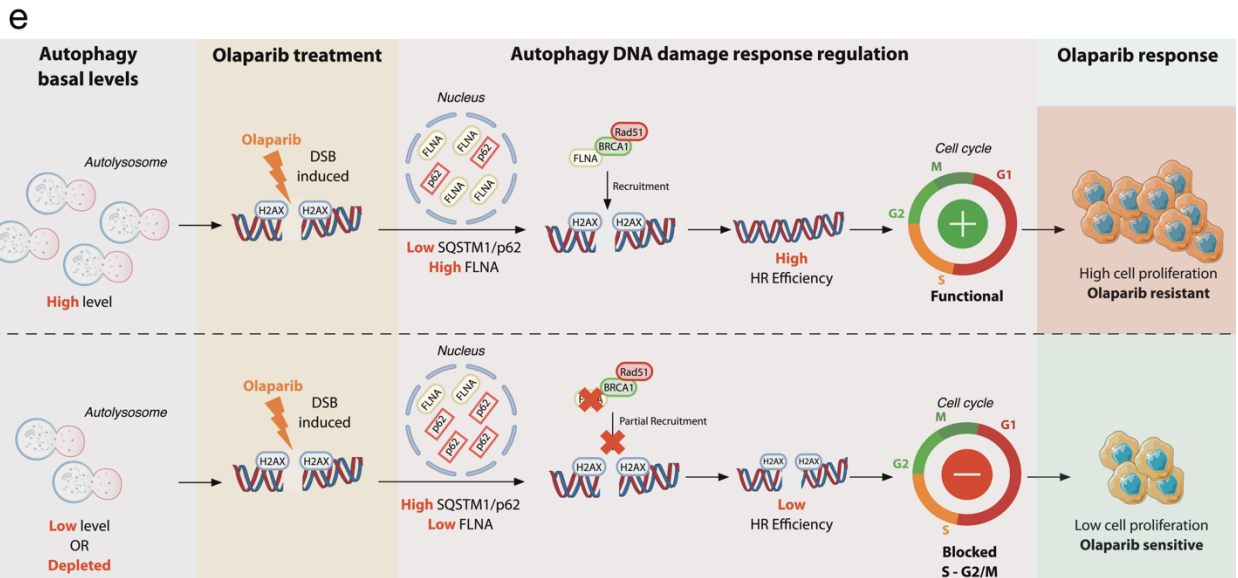
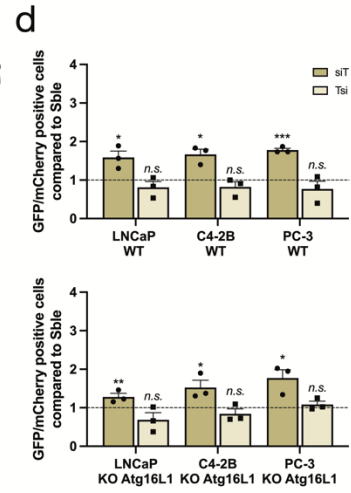
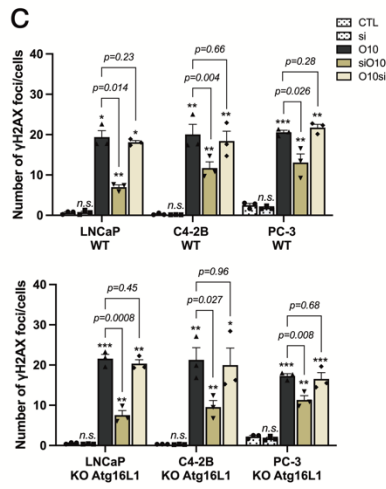
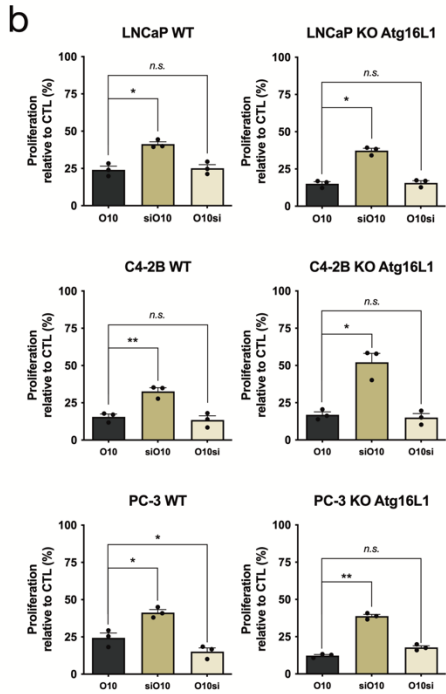
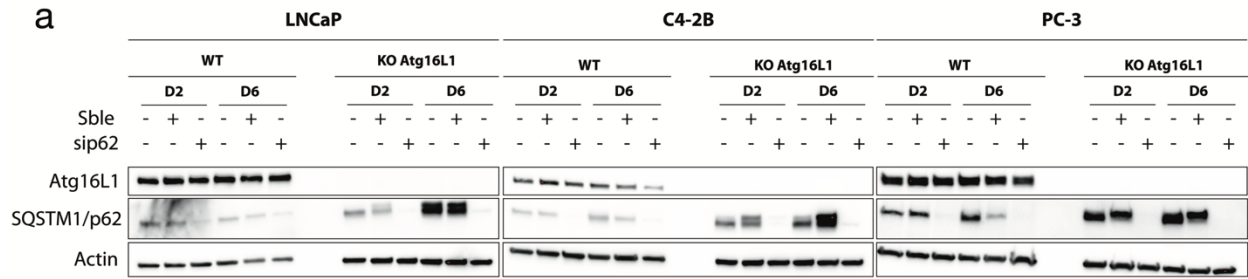
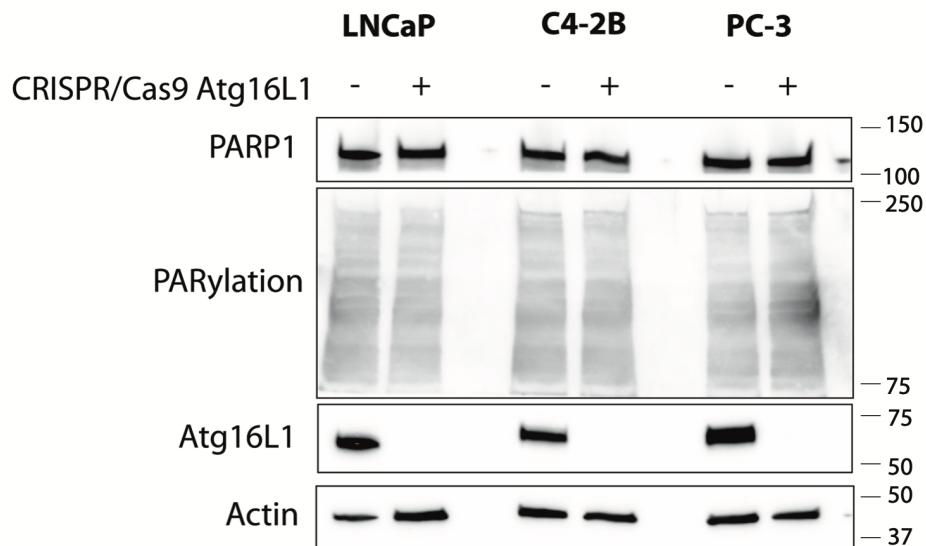
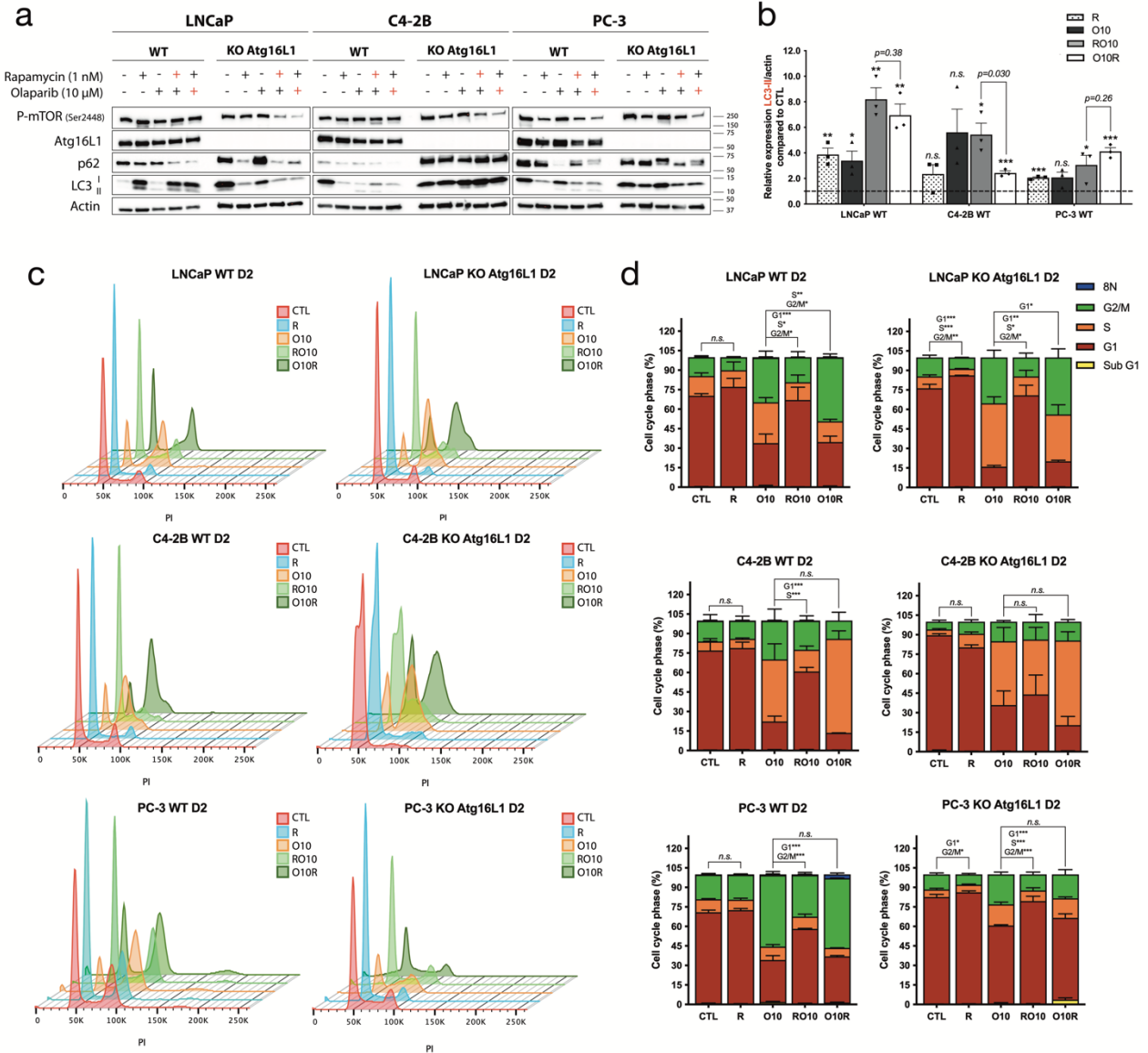


Figure 6: Targeting SQSTM1/p62 rescue autophagy-mediated resistance in PC KO *Atg16L1* cell lines. (a). Validation of efficacy of siRNA against SQSTM1/p62 at day 2 and 6. (b). Cell proliferation of PC WT and KO cell lines following transfection with siRNA against SQSTM1/p62 alone (si) or 24 hours before olaparib treatment (siO10) or after (O10si) at day 2 (c). Quantification of the number of γ -H2AX foci per nucleus in PC WT and KO cell lines in same conditions as (b). (d). Quantification of HR (DR-GFP) activity when SQSTM1/p62 was targeted with a siRNA 24 hours before (siT) or after (Tsi) plasmids co-transfection. For all data, the mean \pm SEM of three independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tail Student t test. n.s. = non-significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (e). This schematic proposes how autophagy activation may determine the PC cell response to olaparib. When higher level of autophagy is present prior to olaparib treatment, nuclear levels of SQSTM1/p62 are low that prevents degradation of FLNA thereby promoting HR by recruiting Rad51 and BRCA1 to DNA breaks induced by olaparib. This allows PC cells to proliferate, leading to a resistance phenotype. If autophagy level is low prior to olaparib treatment, SQSTM1/p62 is not sufficiently cleared leading to higher levels of SQSTM1/p62 to target FLNA for degradation. This downregulation of FLNA reduces the efficiency of HR, leading to partial repair of DNA breaks and an olaparib-sensitive phenotype. Parts of this schematic proposes were drawn using pictures from Servier Medical Art. Servier Medical Art by Servier is licensed under a [Creative Commons Attribution 3.0 Unported License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

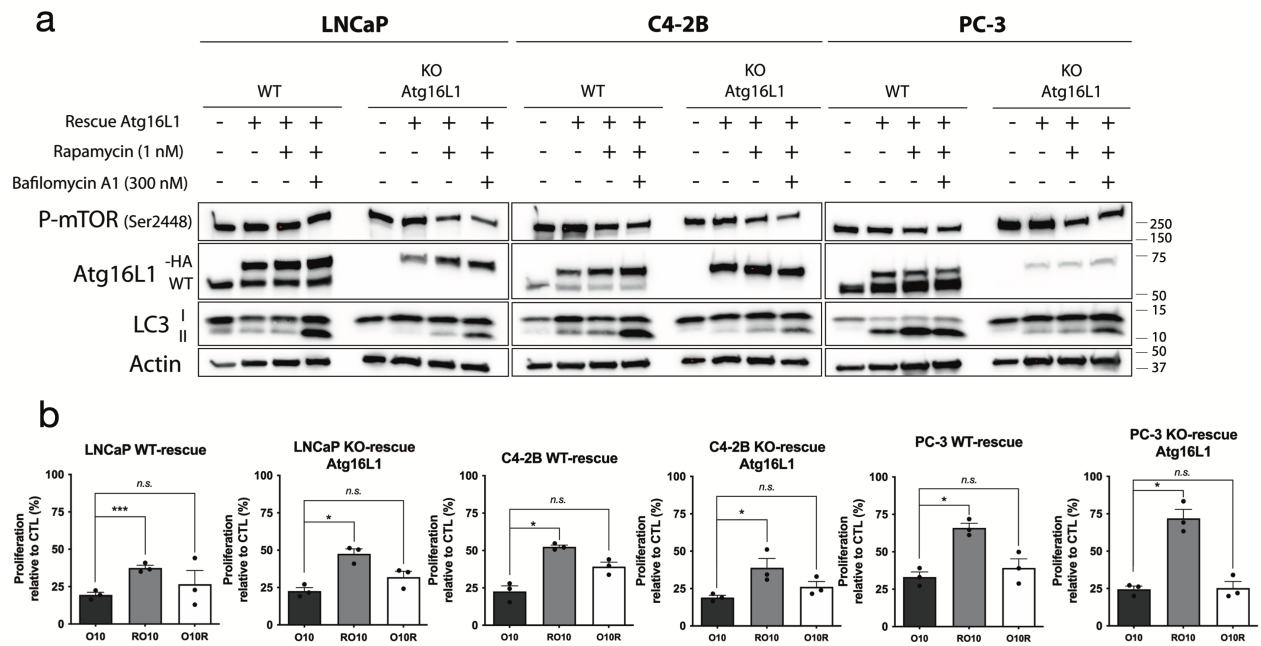
1.1.2.10. SUPPLEMENTARY INFORMATION



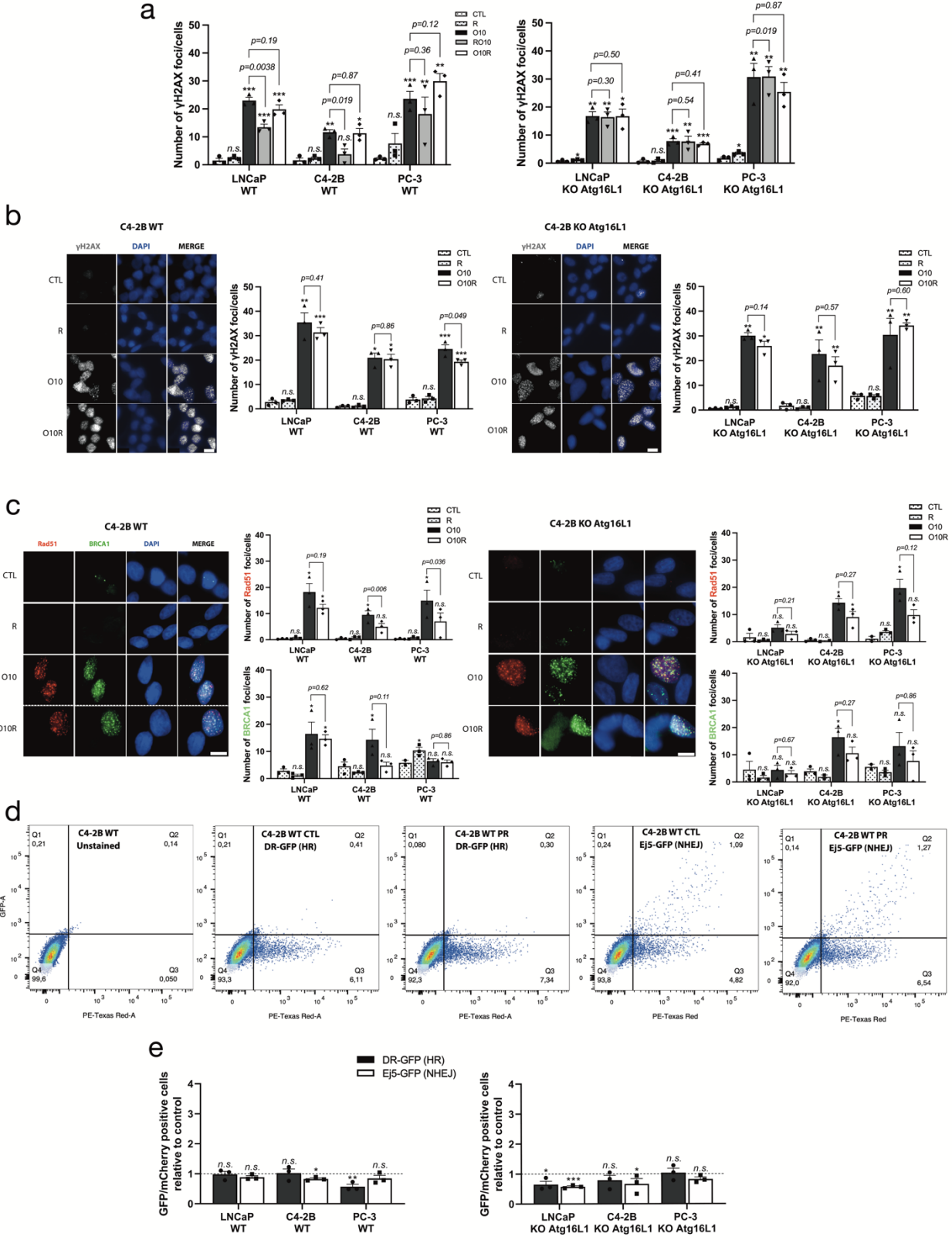
Supplementary Figure 1: Depletion of autophagy does not affect PARP1 expression and PARylation. Western blot analyses of PARP1 expression and PARylation between PC WT and KO *Atg16L1* cell lines.



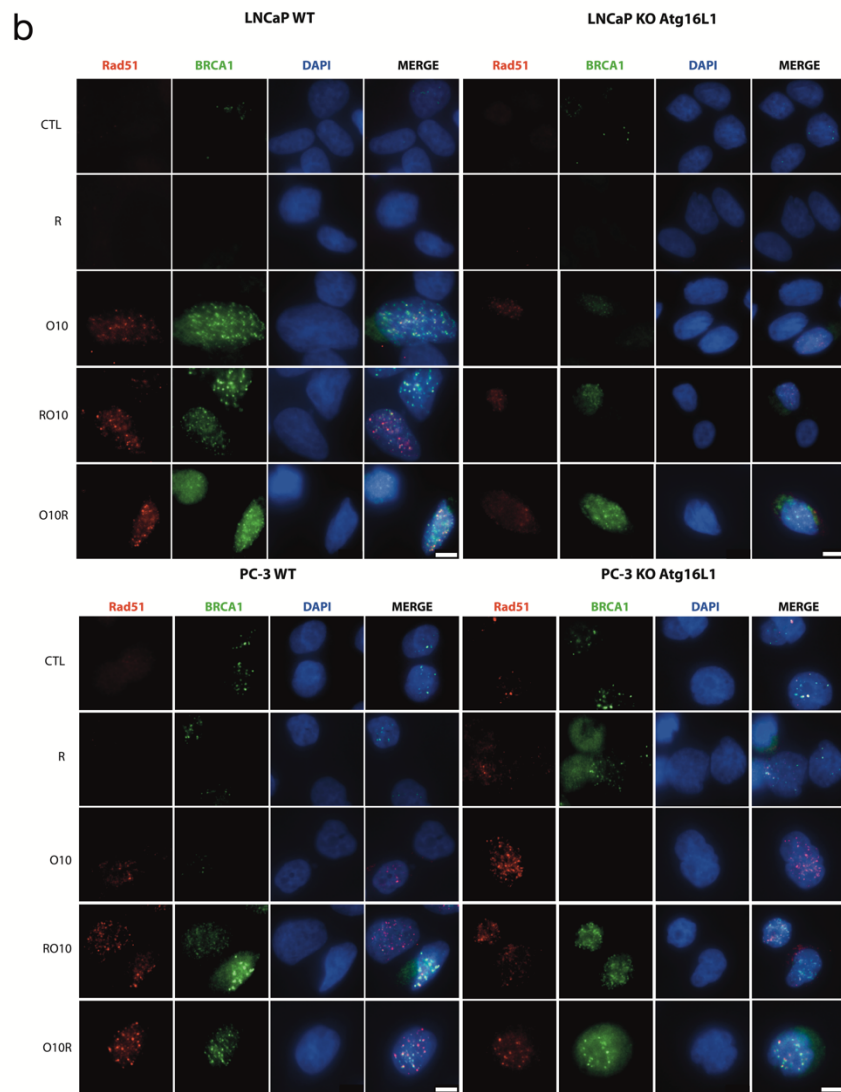
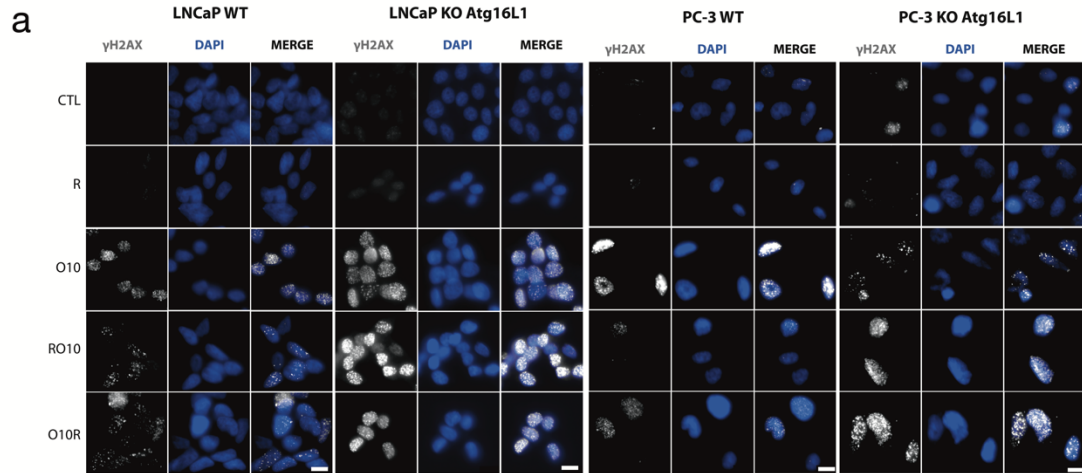
Supplementary Figure 2: Pre-activation of autophagy by rapamycin decreases effects of olaparib on cell cycle at day 2. **(a).** Western blot analyses of autophagy induction after olaparib and rapamycin treatments in WT and KO cell lines at day 6 performed at the same time as Fig. 3b. Rapamycin (+) denotes RO10. Olaparib (+) denotes O10R. **(b).** Relative expression of LC3-II normalized with actin and compared to control (CTL) from (a). **(c).** Representative flow analysis of DNA content (PI) for cell cycle measurement following 2 days of treatment of WT and KO PC cell lines **(d).** Quantification of (c). For all data, the mean \pm SEM of three independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tail Student t-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.



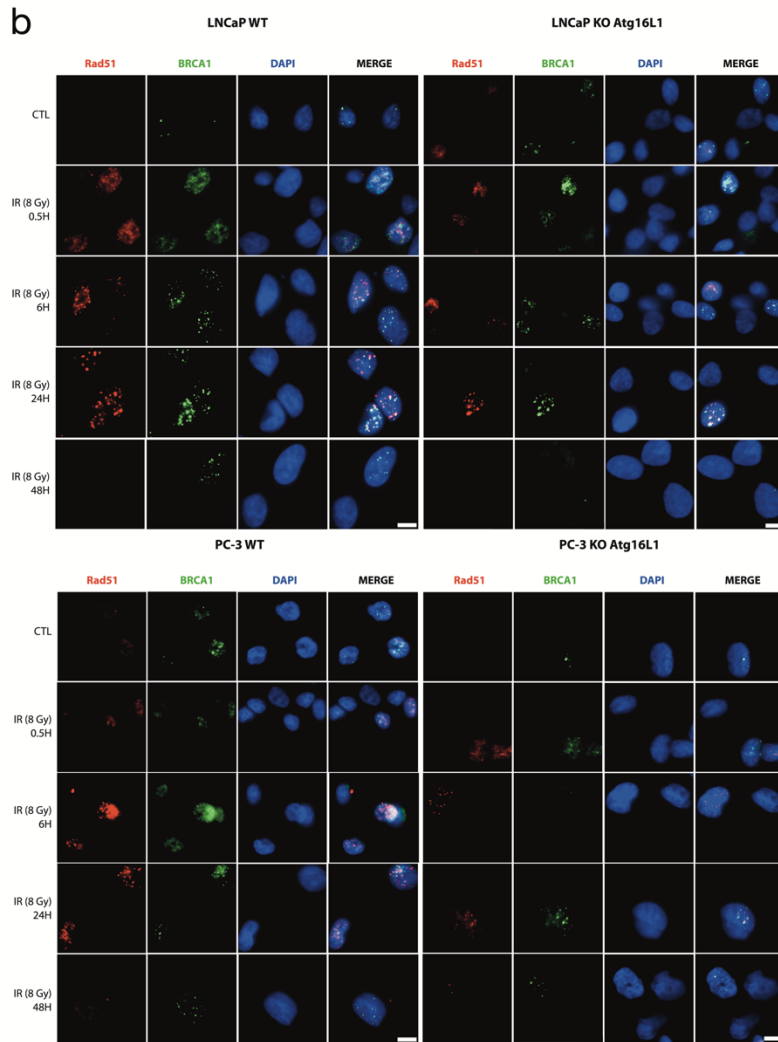
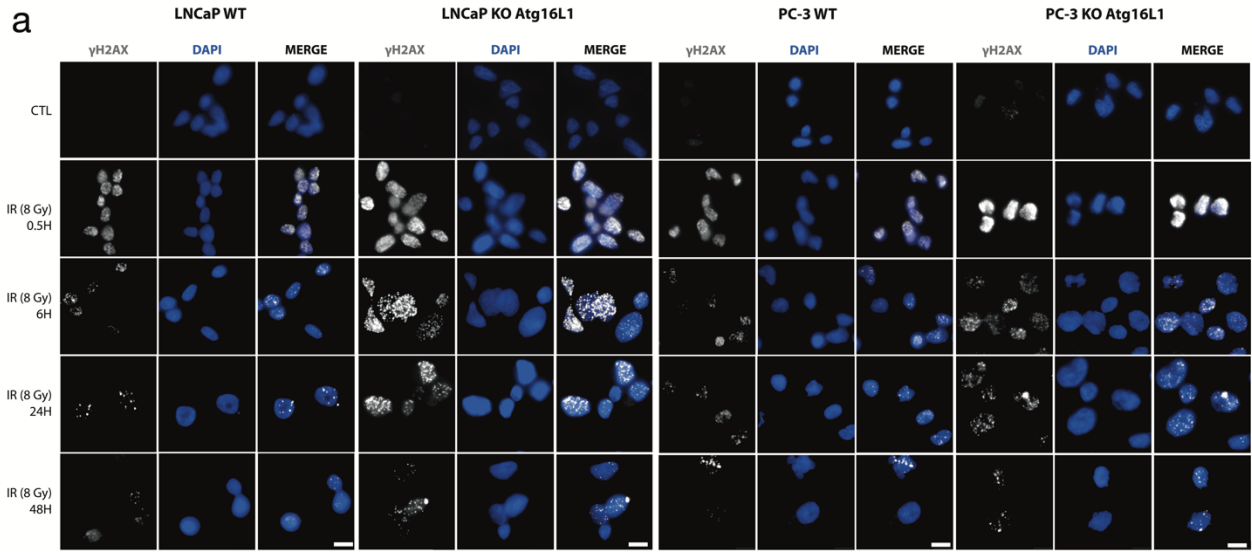
Supplementary Figure 3: Rescue of Atg16L1 expression restore autophagy-mediated resistance in PC KO *Atg16L1* cell lines. (a). Confirmation of restoration of autophagy after Atg16L1-HA rescue in PC WT and KO *Atg16L1* cell lines under control, autophagy-induced and autophagy-blocked conditions by western blot analysis. **(b).** Cell proliferation of WT-rescue *Atg16L1* and KO-rescue *Atg16L1* cell lines under O10, RO10 or O10R treatments at day 6. For all data, the mean \pm SEM of three independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tail Student t test. n.s. = non-significant. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.



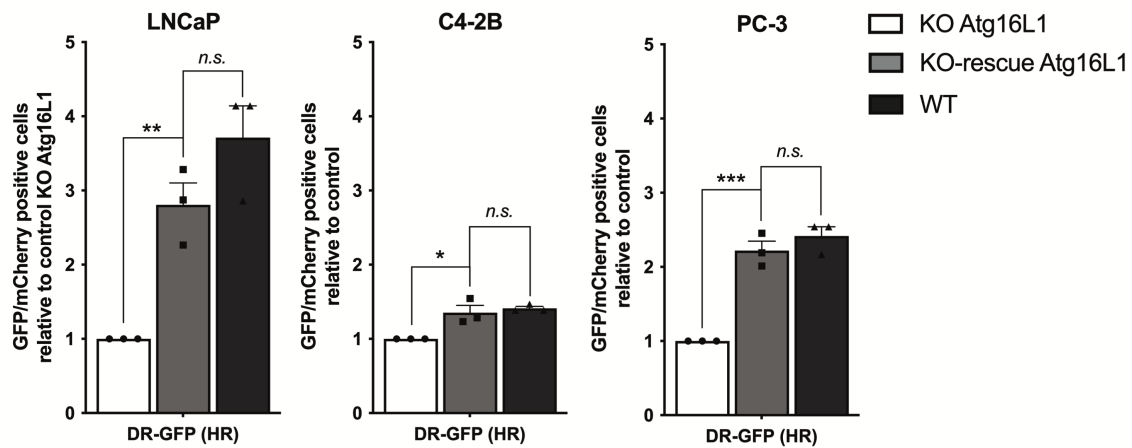
Supplementary Figure 4: Autophagy activation after olaparib treatment does not increase HR activity. **(a)**. Quantification of γ -H2AX foci in WT and *Atg16L1* KO cell lines following treatment with rapamycin alone (R), O10 or RO10 after 6 days. **(b)**. Representative images (C4-2B WT and KO *Atg16L1*) and quantification of number of γ -H2AX foci per nucleus cell lines following treatment of rapamycin alone (R), O10 or O10R treatments after 2 days. **(c)**. Representative images (C4-2B WT and KO *Atg16L1*) and quantification of Rad51 and BRCA1 foci following same conditions as (b). **(d)**. Representative gating strategy to quantification of HR (DR-GFP) and NHEJ (Ej5-GFP) in unstained, control and when autophagy was activated by rapamycin 24 hours after plasmids co-transfection (TR) in C4-2B WT. **(e)**. Quantification of (d). All experiments were performed at the same time as Fig. 3. For all data, the mean \pm SEM of three independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tail Student t test. n.s. = non-significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. Scale bar 10 μ m.



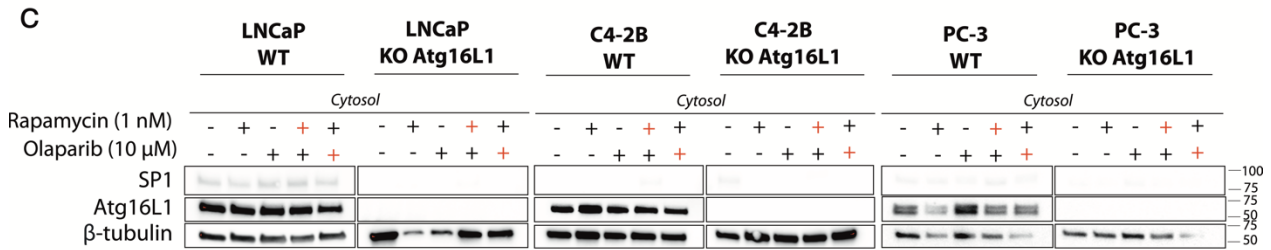
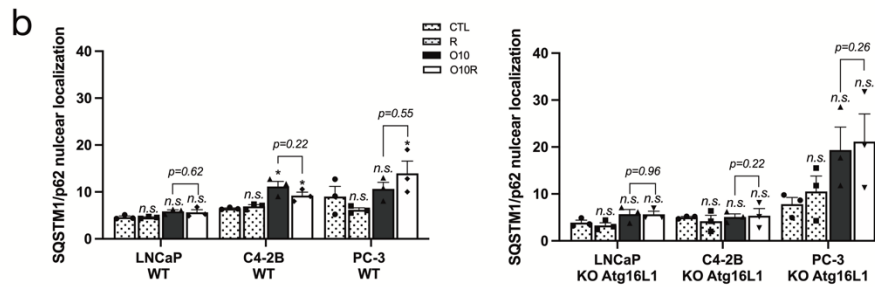
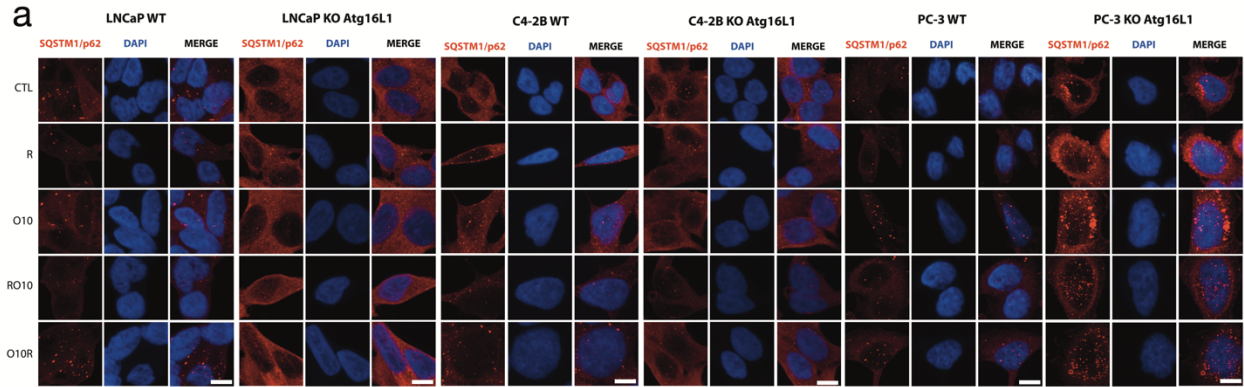
Supplementary Figure 5: Autophagy pre-activation leads to an increase of Rad51/BRCA1 recruitment and H2AX resolution. **(a)**. Representative images of number of γ -H2AX foci per nucleus in LNCaP and PC-3 WT and KO cells following Fig. 3 conditions. **(b)**. Representative images of number of Rad51 and BRCA1 foci per nucleus in the same PC cell lines and following Fig. 3 conditions. Scale bar 10 μ m.



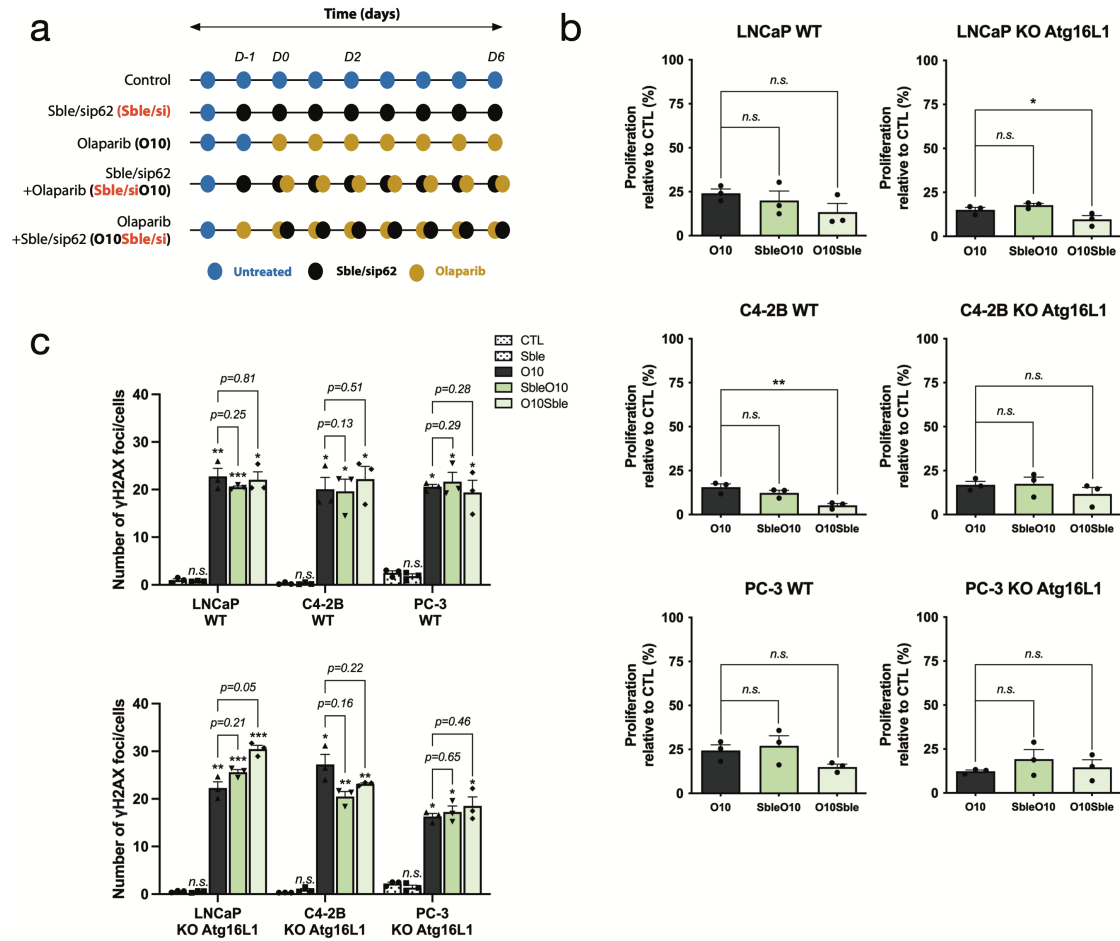
Supplementary Figure 6: Autophagy-depleted PC cells have a lower recruitment of BRCA1/Rad51 to repair DNA breaks. **(a)**. Representative images of number of γ -H2AX foci per nucleus in WT and KO cells of LNCaP and PC-3 following Fig. 4 conditions. **(b)**. Representative images of number of Rad51 and BRCA1 foci per nucleus in WT and KO cells of LNCaP and PC-3 after 8 Gy irradiation. Scale bar 10 μ m.



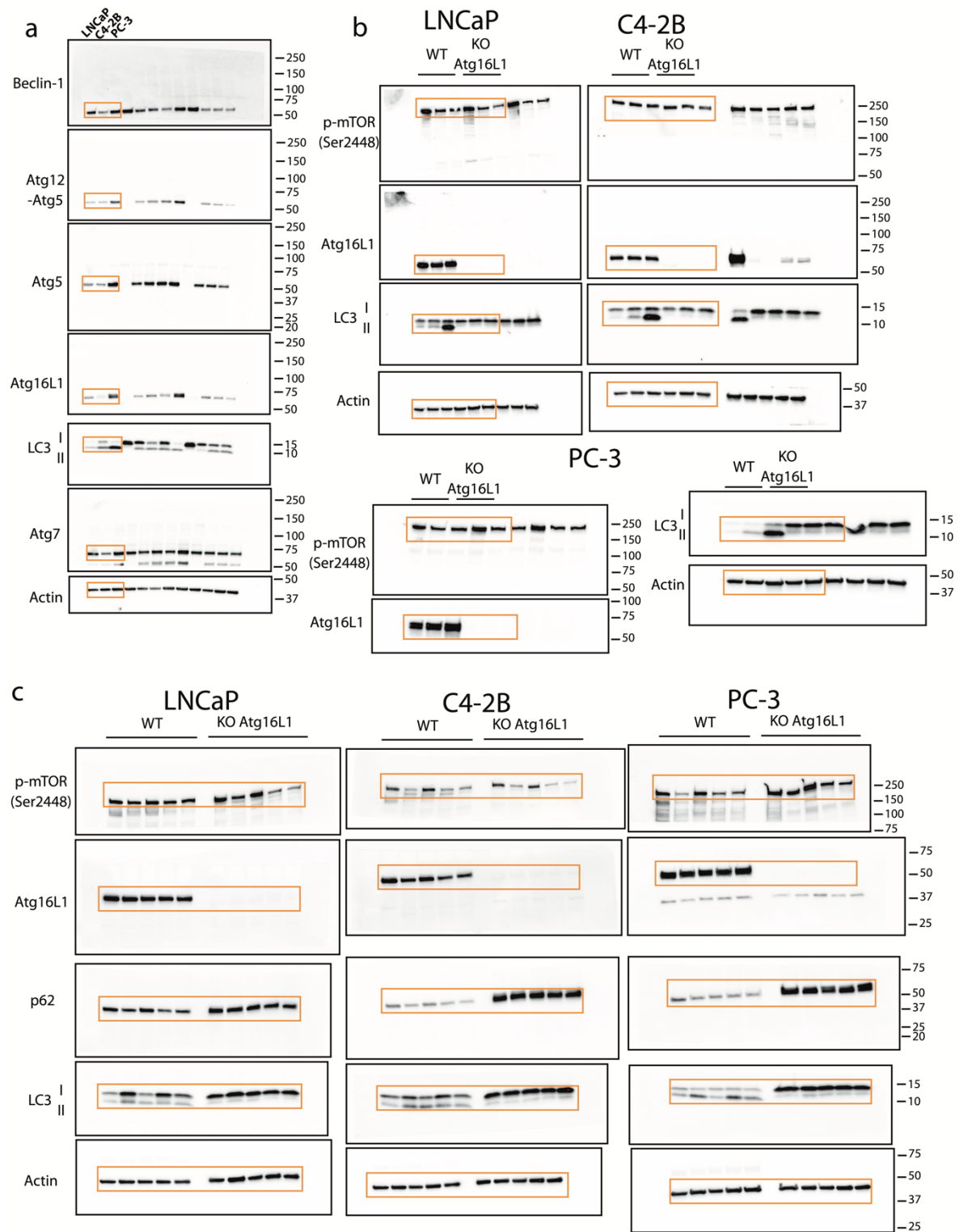
Supplementary Figure 7: Rescue of Atg16L1 restore DNA repair HR efficiency. Quantification of HR (DR-GFP) activity in PC WT and KO-rescue *Atg16L1* cell lines compared to PC KO *Atg16L1*. The ratio of GFP-positive cells versus mCherry-positive cells was determined by flow cytometry. For all data, the mean \pm SEM of three independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tail Student t test. n.s. = non-significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

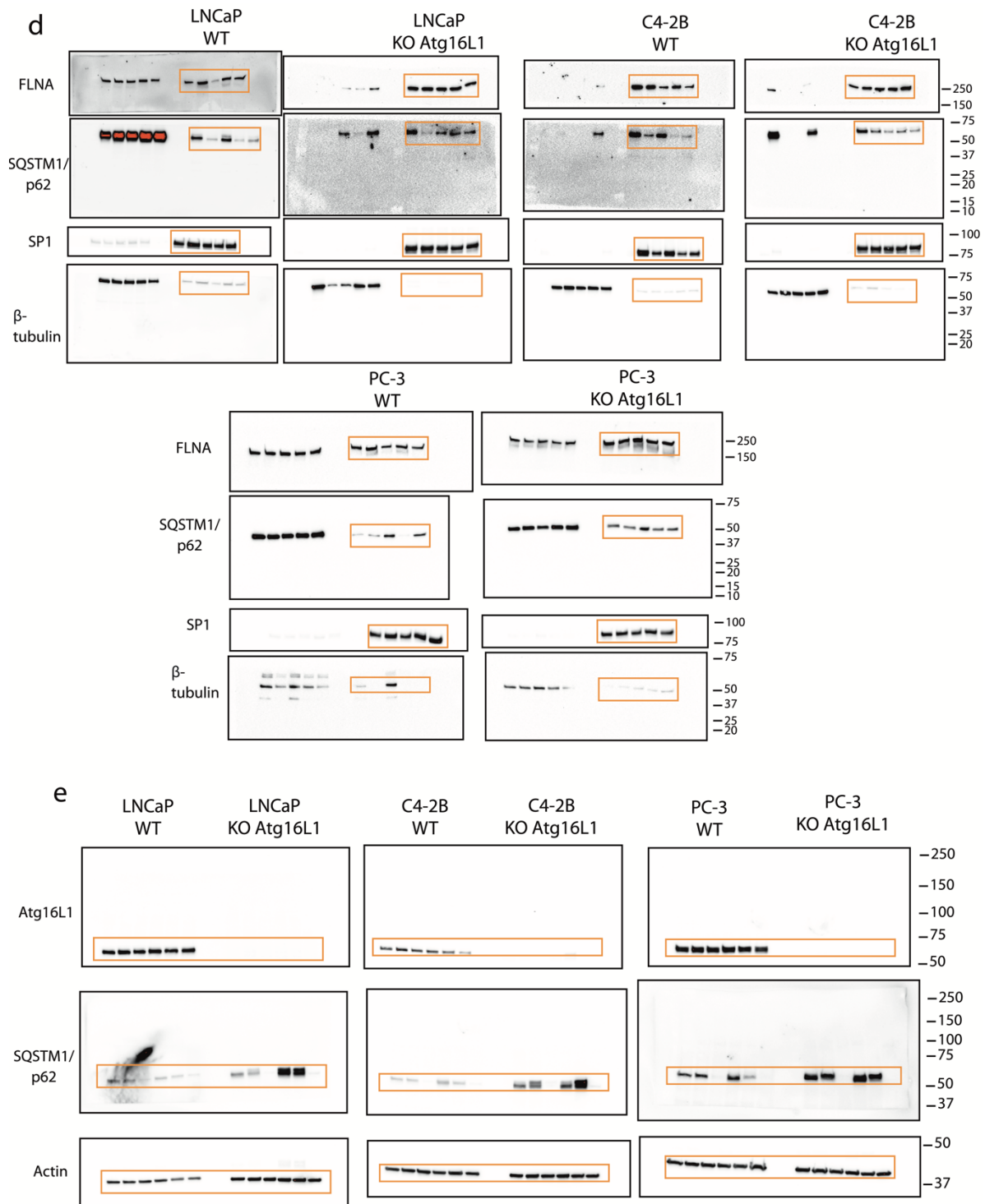


Supplementary Figure 8: SQSTM1/p62 nuclear localization regulates autophagy-mediated resistance to olaparib. (a). Representative images of number of SQSTM1/p62 puncta in WT and KO *Atg16L1* cell lines following rapamycin alone (R), O10 or O10R treatments after 2 days. **(b).** Quantification of nuclear SQSTM1/p62 in WT and KO cell lines in the same conditions as (a). **(c).** Western blot of cytoplasmic fraction after 2 days of RO10 and O10R treatment in PC WT and KO *Atg16L1* cell lines. Each cytoplasmic fraction was loaded in the same gel as nuclear fraction in Fig. 5. β -tubulin was used as quality control as marker of cytoplasmic fraction, SP1 as a marker of nuclear fraction and Atg16L1 as a confirmation of PC KO *Atg16L1* cell lines. For all data, the mean \pm SEM of three independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tail Student t test. n.s. = non-significant. * $p < 0.05$. Scale bar 10 μ m.



Supplementary Figure 9: Scramble transfection does not affect cell proliferation or γ -H2AX foci resolution. **(a).** Transfection timeline of cell lines. Cells were treated with 10 μ M olaparib alone (denoted as O10) or transfected with siRNA against SQSTM1/p62 (si) or with scramble (Sble 24 hours before (Sble/siO10) or 24 hours after (O10Sble/si) the start of olaparib treatment. Experiments were conducted for 6 days. **(b).** Cell proliferation of PC WT and KO *Atg16L1* cell lines in SbleO10 and O10Sble conditions at day 6, performed at the same time as Fig.6c. **(c).** Quantification of the number of γ -H2AX foci per nucleus in PC WT-rescue and KO-rescue cell lines following transfection with scramble (Sble) or 24 hours before olaparib treatment (SbleO10) or after (O10Sble) at day 2. All Sble conditions were performed at the same time as all siRNA conditions. For all data, the mean \pm SEM of three independent experiments is shown. Data were analyzed using the two-tail Student t test. n.s. = non-significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.





Supplementary Figure 10: Uncropped blots. (a) Blots from Figure 1b. (b) Blots from Figure 1f. (c) Blots from Figure 2b. (d) Blots from Figure 5c. (e) Blots from Figure 6a.

1.1.2.11. TABLE

Table 1. IC₅₀ values for olaparib between PC wild-type and KO *Atg16L1* cell lines

Cell lines	Olaparib (μM)		<i>p</i> -value
	WT	KO Atg16L1	
LNCaP	0.17 \pm 0.11	0.059 \pm 0.016	<i>p</i> =0.036
C4-2B	0.079 \pm 0.01	0.009 \pm 0.0002	<i>p</i> =0.0044
PC-3	2.12 \pm 0.25	1.52 \pm 0.045	<i>p</i> =0.067

1.1.2.12. REFERENCES

- 1 Brenner, D. R. et al. Projected estimates of cancer in Canada in 2020. *CMAJ* 192, E199-E205, doi:10.1503/cmaj.191292 (2020).
- 2 Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 71, 7-33, doi:10.3322/caac.21654 (2021).
- 3 Robinson, D. et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 161, 1215-1228, doi:10.1016/j.cell.2015.05.001 (2015).
- 4 Mateo, J. et al. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med* 373, 1697-1708, doi:10.1056/NEJMoa1506859 (2015).
- 5 Warner, E. W., Yip, S. M., Chi, K. N. & Wyatt, A. W. DNA repair defects in prostate cancer: impact for screening, prognostication and treatment. *BJU Int*, doi:10.1111/bju.14576 (2018).
- 6 Farmer, H. et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917-921, doi:10.1038/nature03445 (2005).
- 7 Schoonen, P. M. et al. Progression through mitosis promotes PARP inhibitor-induced cytotoxicity in homologous recombination-deficient cancer cells. *Nature communications* 8, 15981, doi:10.1038/ncomms15981 (2017).
- 8 Bryant, H. E. et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434, 913-917, doi:10.1038/nature03443 (2005).
- 9 Pommier, Y., O'Connor, M. J. & de Bono, J. Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action. *Sci Transl Med* 8, 362ps317, doi:10.1126/scitranslmed.aaf9246 (2016).
- 10 Saad, F. et al. Emerging therapeutic targets for patients with advanced prostate cancer. *Cancer Treat Rev* 76, 1-9, doi:10.1016/j.ctrv.2019.03.002 (2019).
- 11 Nizialek, E. & Antonarakis, E. S. PARP Inhibitors in Metastatic Prostate Cancer: Evidence to Date. *Cancer Manag Res* 12, 8105-8114, doi:10.2147/CMAR.S227033 (2020).

- 12 Clarke, N. et al. Olaparib combined with abiraterone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 19, 975-986, doi:10.1016/S1470-2045(18)30365-6 (2018).
- 13 Quigley, D. et al. Analysis of Circulating Cell-Free DNA Identifies Multiclonal Heterogeneity of BRCA2 Reversion Mutations Associated with Resistance to PARP Inhibitors. *Cancer Discov* 7, 999-1005, doi:10.1158/2159-8290.Cd-17-0146 (2017).
- 14 Montoni, A., Robu, M., Pouliot, E. & Shah, G. M. Resistance to PARP-Inhibitors in Cancer Therapy. *Front Pharmacol* 4, 18, doi:10.3389/fphar.2013.00018 (2013).
- 15 Fleury, H. et al. Cumulative defects in DNA repair pathways drive the PARP inhibitor response in high-grade serous epithelial ovarian cancer cell lines. *Oncotarget* 8, 40152-40168, doi:10.18632/oncotarget.10308 (2017).
- 16 Fleury, H. et al. Exploiting interconnected synthetic lethal interactions between PARP inhibition and cancer cell reversible senescence. *Nature communications* 10, 2556, doi:10.1038/s41467-019-10460-1 (2019).
- 17 Barakat, D. J. et al. C/EBPbeta regulates sensitivity to bortezomib in prostate cancer cells by inducing REDD1 and autophagosome-lysosome fusion. *Cancer Lett* 375, 152-161, doi:10.1016/j.canlet.2016.03.005 (2016).
- 18 Liu, J., Chen, Z., Guo, J., Wang, L. & Liu, X. Ambra1 induces autophagy and desensitizes human prostate cancer cells to cisplatin. *Biosci Rep*, doi:10.1042/BSR20170770 (2017).
- 19 Nguyen, H. G. et al. Targeting autophagy overcomes Enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cells and improves therapeutic response in a xenograft model. *Oncogene* 33, 4521-4530, doi:10.1038/onc.2014.25 (2014).
- 20 Korolchuk, V. I., Menzies, F. M. & Rubinsztein, D. C. A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Autophagy* 5, 862-863, doi:10.4161/auto.8840 (2009).
- 21 Hewitt, G. et al. SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair. *Autophagy* 12, 1917-1930, doi:10.1080/15548627.2016.1210368 (2016).

- 22 Sharma, A. et al. USP14 regulates DNA damage repair by targeting RNF168-dependent ubiquitination. *Autophagy* 14, 1976-1990, doi:10.1080/15548627.2018.1496877 (2018).
- 23 Kim, J. S. et al. Prognostic Significance of LC3B and p62/SQSTM1 Expression in Gastric Adenocarcinoma. *Anticancer Res* 39, 6711-6722, doi:10.21873/anticancer.13886 (2019).
- 24 Iwadate, R. et al. High Expression of SQSTM1/p62 Protein Is Associated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *Acta Histochem Cytochem* 47, 295-301, doi:10.1267/ahc.14048 (2014).
- 25 Falasca, L. et al. AMBRA1 and SQSTM1 expression pattern in prostate cancer. *Apoptosis* 20, 1577-1586, doi:10.1007/s10495-015-1176-3 (2015).
- 26 Blessing, A. M. et al. Transcriptional regulation of core autophagy and lysosomal genes by the androgen receptor promotes prostate cancer progression. *Autophagy* 13, 506-521, doi:10.1080/15548627.2016.1268300 (2017).
- 27 Shi, Y. et al. Androgens promote prostate cancer cell growth through induction of autophagy. *Mol Endocrinol* 27, 280-295, doi:10.1210/me.2012-1260 (2013).
- 28 Hu, F. et al. Docetaxel-mediated autophagy promotes chemoresistance in castration-resistant prostate cancer cells by inhibiting STAT3. *Cancer Lett* 416, 24-30, doi:10.1016/j.canlet.2017.12.013 (2018).
- 29 Wang, Q., He, W. Y., Zeng, Y. Z., Hossain, A. & Gou, X. Inhibiting autophagy overcomes docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer cells. *Int Urol Nephrol*, doi:10.1007/s11255-018-1801-5 (2018).
- 30 Yasumizu, Y. et al. Dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 sensitizes docetaxel in castration resistant prostate cancer. *J Urol* 191, 227-234, doi:10.1016/j.juro.2013.07.101 (2014).
- 31 Arun, B., Akar, U., Gutierrez-Barrera, A. M., Hortobagyi, G. N. & Ozpolat, B. The PARP inhibitor AZD2281 (Olaparib) induces autophagy/mitophagy in BRCA1 and BRCA2 mutant breast cancer cells. *Int J Oncol* 47, 262-268, doi:10.3892/ijo.2015.3003 (2015).

- 32 Sui, H., Shi, C., Yan, Z. & Li, H. Combination of erlotinib and a PARP inhibitor inhibits growth of A2780 tumor xenografts due to increased autophagy. *Drug Des Devel Ther* 9, 3183-3190, doi:10.2147/DDDT.S82035 (2015).
- 33 Li, J., Kim, S. G. & Blenis, J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab* 19, 373-379, doi:10.1016/j.cmet.2014.01.001 (2014).
- 34 Mani, C. et al. Prexasertib treatment induces homologous recombination deficiency and synergizes with olaparib in triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 21, 104, doi:10.1186/s13058-019-1192-2 (2019).
- 35 Yang, X., Ndawula, C., Jr., Zhou, H., Gong, X. & Jin, J. JF-305, a pancreatic cancer cell line is highly sensitive to the PARP inhibitor olaparib. *Oncol Lett* 9, 757-761, doi:10.3892/ol.2014.2762 (2015).
- 36 Pirotte, E. F. et al. Sensitivity to inhibition of DNA repair by Olaparib in novel oropharyngeal cancer cell lines infected with Human Papillomavirus. *PLoS One* 13, e0207934, doi:10.1371/journal.pone.0207934 (2018).
- 37 Mah, L. J., El-Osta, A. & Karagiannis, T. C. gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24, 679-686, doi:10.1038/leu.2010.6 (2010).
- 38 Wang, Y. et al. Autophagy Regulates Chromatin Ubiquitination in DNA Damage Response through Elimination of SQSTM1/p62. *Molecular cell* 63, 34-48, doi:10.1016/j.molcel.2016.05.027 (2016).
- 39 Abreu, M. M. & Sealy, L. The C/EBPbeta isoform, liver-inhibitory protein (LIP), induces autophagy in breast cancer cell lines. *Exp Cell Res* 316, 3227-3238, doi:10.1016/j.yexcr.2010.07.021 (2010).
- 40 Belounis, A. et al. Autophagy is associated with chemoresistance in neuroblastoma. *BMC Cancer* 16, 891, doi:10.1186/s12885-016-2906-9 (2016).
- 41 Cristofani, R. et al. Dual role of autophagy on docetaxel-sensitivity in prostate cancer cells. *Cell Death Dis* 9, 889, doi:10.1038/s41419-018-0866-5 (2018).

- 42 Farrow, J. M., Yang, J. C. & Evans, C. P. Autophagy as a modulator and target in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 11, 508-516, doi:10.1038/nrurol.2014.196 (2014).
- 43 Osoegawa, A., Gills, J. J., Kawabata, S. & Dennis, P. A. Rapamycin sensitizes cancer cells to growth inhibition by the PARP inhibitor olaparib. *Oncotarget* 8, 87044-87053, doi:10.18632/oncotarget.19667 (2017).
- 44 Li, S. et al. Potent antitumour of the mTORC1/2 dual inhibitor AZD2014 in docetaxel-sensitive and docetaxel-resistant castration-resistant prostate cancer cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, doi:10.1111/jcmm.16155 (2021).
- 45 Sini, P., James, D., Chresta, C. & Guichard, S. Simultaneous inhibition of mTORC1 and mTORC2 by mTOR kinase inhibitor AZD8055 induces autophagy and cell death in cancer cells. *Autophagy* 6, 553-554, doi:10.4161/auto.6.4.11671 (2010).
- 46 Xu, F. et al. Autophagy Promotes the Repair of Radiation-Induced DNA Damage in Bone Marrow Hematopoietic Cells via Enhanced STAT3 Signaling. *Radiat Res* 187, 382-396, doi:10.1667/RR14640.1 (2017).
- 47 Polkinghorn, W. R. et al. Androgen receptor signaling regulates DNA repair in prostate cancers. *Cancer Discov* 3, 1245-1253, doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0172 (2013).
- 48 Feiersinger, G. E. et al. Olaparib is effective in combination with, and as maintenance therapy after, first-line endocrine therapy in prostate cancer cells. *Mol Oncol* 12, 561-576, doi:10.1002/1878-0261.12185 (2018).
- 49 Jividen, K. et al. Genomic analysis of DNA repair genes and androgen signaling in prostate cancer. *BMC Cancer* 18, 960, doi:10.1186/s12885-018-4848-x (2018).
- 50 Yamagishi, T. et al. P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration. *J Biol Chem* 288, 31761-31771, doi:10.1074/jbc.M113.514091 (2013).

- 51 Kazmi, F. et al. Lysosomal sequestration (trapping) of lipophilic amine (cationic amphiphilic) drugs in immortalized human hepatocytes (Fa2N-4 cells). *Drug Metab Dispos* 41, 897-905, doi:10.1124/dmd.112.050054 (2013).
- 52 Zhitomirsky, B. & Assaraf, Y. G. Lysosomal sequestration of hydrophobic weak base chemotherapeutics triggers lysosomal biogenesis and lysosome-dependent cancer multidrug resistance. *Oncotarget* 6, 1143-1156, doi:10.18632/oncotarget.2732 (2015).
- 53 Zhao, B. et al. TFEB-mediated lysosomal biogenesis and lysosomal drug sequestration confer resistance to MEK inhibition in pancreatic cancer. *Cell Death Discov* 6, 12, doi:10.1038/s41420-020-0246-7 (2020).
- 54 Hansen, A. R. et al. Pantoprazole Affecting Docetaxel Resistance Pathways via Autophagy (PANDORA): Phase II Trial of High Dose Pantoprazole (Autophagy Inhibitor) with Docetaxel in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (mCRPC). *Oncologist* 24, 1188-1194, doi:10.1634/theoncologist.2018-0621 (2019).
- 55 Wolpin, B. M. et al. Phase II and pharmacodynamic study of autophagy inhibition using hydroxychloroquine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Oncologist* 19, 637-638, doi:10.1634/theoncologist.2014-0086 (2014).
- 56 Astolfi, M. et al. Micro-dissected tumor tissues on chip: an ex vivo method for drug testing and personalized therapy. *Lab on a chip* 16, 312-325, doi:10.1039/c5lc01108f (2016).
- 57 Simeone, K. et al. Paraffin-embedding lithography and micro-dissected tissue micro-arrays: tools for biological and pharmacological analysis of ex vivo solid tumors. *Lab on a chip* 19, 693-705, doi:10.1039/c8lc00982a (2019).

2. Article #2 : Development of olaparib-resistant prostate cancer cell lines to identify mechanisms associated with acquired resistance.

2.1.1. Résumé en français

Titre en français : Développement de lignées du cancer de la prostate résistantes à l'olaparib afin de découvrir les mécanismes associés à la résistance acquise.

Les inhibiteurs de PARP (PARPi) ciblent les tumeurs de l'ovaire et du sein ayant des mutations au niveau des gènes de réponse aux dommages à l'ADN. Malgré leurs effets prometteurs sur la survie des patientes, certaines développent une résistance au cours du temps. Récemment les PARPi ont démontré avoir un effet bénéfique chez les patients atteints d'un cancer de la prostate (CP) ayant des options thérapeutiques limitées. Malheureusement, l'apparition de résistance pour ces inhibiteurs est encore trop peu connue dans ce type de cancer. Ainsi, étudier comment elle se met en place permettrait de l'éviter et de maintenir l'efficacité de ces inhibiteurs. Dans cette étude, nous avons développé de nouvelles lignées de CP résistantes à l'olaparib (OR), les LNCaP-OR, C4-2B-OR et DU145-OR. L'IC50 de ces lignées OR était significativement augmentée sans modification de leur temps de doublement ou de leur morphologie. L'analyse microarray a révélé que plusieurs voies moléculaires, comme les mécanismes de réparation de l'ADN, le cycle cellulaire ainsi que l'autophagie, étaient affectées par la transformation OR. Un total de 195 gènes avait une augmentation significative de leur expression et 87 gènes avec une diminution significative de leur expression dans les trois lignées OR ont été obtenus. Parmi ces gènes, *BRCC3*, *ROCK2* et *ATG2B*, sont des cibles potentielles pour inverser la résistance acquise à l'olaparib. Notre étude apporte un nouveau modèle *in vitro* pour explorer cette résistance dans le cancer de la prostate et suggère de possibles nouvelles cibles pour l'inverser et prolonger l'efficacité des PARPi.

2.1.2. Version originale en préparation pour Cancers

Development of olaparib-resistant prostate cancer cell lines to identify mechanisms associated with acquired PARPi resistance

Maxime Cahuzac^{1,2}, Benjamin Péant^{1,2}, Anne-Marie Mes-Masson^{1,2,3} and Fred Saad^{1,2,3}

¹ *Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC, Canada*

² *Institut du cancer de Montréal, Montreal, QC, Canada*

³ *Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada*

Corresponding author:

Anne-Marie Mes-Masson PhD, FCAHS, FRSC

Centre de recherche du CHUM, 900 rue Saint-Denis, Montreal QC H2X 0A9

anne-marie.mes-masson@umontreal.ca

514 890-8000, poste 25496

2.1.2.1. ABSTRACT

Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors (PARPi) were initially deployed to target breast and ovarian tumors with mutations in DNA damage response genes. Despite demonstrating promising response rates, many patients treated with PARPi eventually develop resistance. Recently, PARPi have been shown to be beneficial in the treatment of prostate cancer (PC) patients having exhausted conventional therapeutics. However, PARPi resistance in PC is not well understood and further studies are required to understand PARPi resistance in PC in order to propose strategies to circumvent resistance. Starting from well-established olaparib-sensitive PC cell lines (LNCaP, C4-2 and DU145), we developed olaparib-resistant (OR) derivative PC cell lines (LNCaP-OR, C4-2B-OR and DU145-OR). The olaparib IC₅₀ values of OR cell lines increased significantly without affecting doubling time and cell morphology as compared to the parental cell line. Microarray analysis revealed that different pathways, including DNA repair, cell cycle regulation and autophagy were affected following OR transformation. A total of 195 and 87 genes were significantly upregulated and downregulated, respectively, in all three OR cell lines compared to their parental counterparts. Among these genes, *BRCC3*, *ROCK2* and *ATG2B* are potential targets to reverse acquired resistance to olaparib. Our study provides a new in vitro model to study PARPi resistance in prostate cancer and suggests new possible targets that could reverse resistance to prolong the benefits of PARPi treatment.

2.1.2.2. INTRODUCTION

Advances in next generation hormone therapy, such as enzalutamide, or chemotherapy with docetaxel, have helped to improve overall survival in prostate cancer (PC). However, resistance to these therapies is common and associated with an increased risk of aggressive, metastatic disease for which effective treatments are limited. Poly (ADP- ribose) polymerase (PARP) inhibitors (PARPi) are a novel class of anticancer therapeutics that have become part of standard treatment for breast and ovarian cancers carrying BRCA mutations and represent a therapeutic option for treatment-refractory PC. PARPi treatment induces synthetic lethality in tumors carrying mutations in DNA damage response (DDR) genes such as BRCA1, BRCA2 or ATM, which are found to be somatically mutated in approximately 30% of metastatic PC patients^{1,2}. Ongoing clinical trials using PARPi in PC as monotherapy or in combination with hormono- or chemo-therapy have shown potential benefit for patients⁵. The PROfound study comparing the PARPi olaparib versus enzalutamide or abiraterone acetate, demonstrated an increase of radiographic progression-free survival (rPFS) from 3.5 months to 7.39 months for patients treated with olaparib⁶. The combination of olaparib with abiraterone in the PROpel clinical trial study for patients with metastatic castration-resistant PC also indicated an increase of rPFS compared to the control group (13.8 months vs. 8.2 months)⁷. Despite these promising outcomes, the development of PARPi resistance needs to be considered as increasing cases of PARPi resistance have been reported for other cancers.

PARPi target PARP1/2 enzymes which are essential for DNA repair mechanisms, especially base excision repair (BER). The inhibition of BER results in the transformation single strand break to double strand break, which are often not resolved in homologous recombination (HR) deficient tumors leading to cell death. Innate resistance to PARPi is mainly associated with the absence of mutations that impair HR^{4,8}. Other mechanisms, such as autophagy, may also contribute to de novo resistance to PARPi¹⁴. In breast and ovarian cancer acquired resistance can occur via one of three mechanisms: restoration of HR, stabilization of the replication fork, or alterations in drug target and transport⁹. It has been observed that prolonged PARPi treatment of breast and ovarian cancer results in the selection of cells that reverse mutations in BRCA1 and BRCA2 genes to

restore the functionality of HR and reduce the cytotoxic effects of PARPi^{10,11}. Some mutations were also observed in the catalytic site (K199 and S120) of PARP1 to limit PARPi-binding and PARP1-trapping on DNA^{12,13}. Studies also suggest that cancer cells will decrease the activity of the EZH2 enzyme and PTIP binding to limit collapse of the replication fork and chromosomal instability¹⁴. In PC, resistance mechanisms are not well understood or studied.

Here we developed three olaparib-resistant (OR) PC cell lines by exposing LNCaP, C4-2B and DU145 PC cell lines to increasing concentrations of olaparib over a period of six months. OR PC cell lines harbored a higher resistant profile compared to the wild type (WT) PC cells without affecting their doubling time or morphology. Microarray experiments were performed and allowed a transcriptome analysis between olaparib-sensitive and -resistance cell lines. In addition to identifying pathways and genes potentially implicated in acquired resistance in PC, this study also provides useful models for future studies on acquired olaparib-resistance in PC.

2.1.2.3. RESULTS

Generation of PC cell lines with acquired resistance to PARPi olaparib

To characterize mechanisms that contribute to acquired PARPi resistance, we cultivated three PC cell lines, LNCaP, C4-2B and DU145, in medium containing increasing olaparib concentrations for six months (Fig. 1a). Compared to their respective parental cell line, the olaparib IC₅₀ values significantly increased for all three OR cell lines: 4.41-fold change for LNCaP-OR ($p=0.05$), 28.9-fold change for C4-2B-OR ($p=0.024$), and 3.78-fold change for OR DU145-OR ($p=0.0080$) (Fig. 1b and Table 1). Doubling time and cell morphology were not changed by the acquisition of olaparib resistance (Fig. 1c-d). Since PARPi inhibit PARylation by PARP1, the expression of PARP1 and its PARylated forms were measured by Western blot (Fig. 1e). OR cell lines showed a slight decrease in PARylation although PARP1 expression was not affected compared to WT.

Identification of pathways involved in olaparib resistance by microarray analysis

To identify genes and pathways that were associated with acquired olaparib resistance, we performed microarray analysis on the three WT and OR PC cell lines using the Illumina Sentrix platform. The raw data were deposited in the *Gene Expression Omnibus database* ([Onedrive](#)). Gene set enrichment analysis (GSEA) showed that OR cell lines were significantly enriched in pathways involved in PROTEIN_TRANSPORT_ALONG_MICROTUBULE (false discovery rate (FDR) q-value=0.0009), RNA splicing (FDR q-value=0.001) and DNA repair (FDR q-value=0.01), all of which had a normalized enrichment score (NES) above 2.0 (Fig. 2a). Heatmap of enriched genes for PROTEIN_TRANSPORT_ALONG_MICROTUBULE showed that genes for intraflagellar transport 172 and 80 (*IFT172/80*), kinesin family member 5B (*KIF5B*) and ADP ribosylation factor like GTPase 3 (*ARL3*) were upregulated in OR cell lines (Fig. 2b).

Because regulation of DNA repair is one of the known PARPi resistance mechanisms⁹, we selected the top 10 DNA repair mechanisms since HR can be restored in PARPi-resistant cancer cell lines (Fig. 2c). Double-strand break repair (FDR q-value=0.0083, NES=2.04), DNA repair (FDR q-value=0.004, NES=2.02), and recombinational repair (FDR q-value=0.040, NES=1.86) were associated with a higher NES. Non-homologous end-joining (NHEJ) and single strand DNA break

repair pathways such as base or nucleotide excision repair (BER/NER) were not modified during the acquisition of olaparib resistance in this experimental model. GSEA analysis also revealed that *BRCA1/BRCA2*-containing complex subunit 3 (*BRCC3*), Werner syndrome helicase (*WRN*) or *ubiquitin specific peptidase 45* (*USP45*) genes were upregulated in all three OR cell lines compared to WT (Fig. 2d).

We also interrogated the top 10 pathways involved in autophagy as this process has also been reported to induce PARPi resistance¹⁴⁻¹⁶ (Fig. 2e). The GSEA gene set for POSITIVE_REGULATION_OF_MACROAUTOPHAGY was the only pathway that was significantly impacted (FDR q-value=0.040, NES=1.86). This pathway includes genes encoding for protein that increase levels of autophagy such as beclin-1 (*BECN1*), *ATG2B*, or components of the mTOR complex. Among these genes, G protein subunit alpha i3 (*GNAI3*) and TSC complex subunit 1 (*TSC1*) were the most upregulated genes in OR PC cell lines (Fig. 2f).

This first overview analysis showed that pathway which regulates protein transport along microtubule are the most enriched pathway in our OR cell lines. DNA repair mechanisms, especially recombinational repair, and positive regulation of autophagy were also significantly altered by the acquisition of olaparib resistance in PC cell lines.

Identification of potential targets to reverse acquired resistance

To further analyze the genes that were associated with olaparib resistance, the list of differentially expressed genes of the three OR cell lines were compared and revealed that all three shared 222 genes that were upregulated, and 178 genes that were downregulated (Fig. 3a). These genes were entered in a volcano plot to select only genes that had a p-value $\log(-10) \geq 1.3$ and a fold-change (\log_2) ≤ -0.6 and $\geq +0.6$ (Fig. 3b). A total of 195 upregulated and 87 downregulated genes were obtained by applying these cut-offs. The top 20 upregulated and downregulated genes were classified by their significance (Table 2 and 3). Fold enrichment analysis showed that genes regulating cell cycle progression, such as Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2 (*ROCK2*) or Cyclin-dependent kinase 12 (*CDK12*), and genes regulating RNA processing, such as mago homolog exon junction complex subunit (*MAGOH*) or SR-related CTD associated factor 11 (*SCAF1*) were the most represented among the 195 upregulated genes (Fig. 3d). *ATG2B* from the autophagy pathway was also significantly upregulated by 1.65-fold change (\log_2) (p-value $\log(-$

10)=2.65). Other genes, as *GNAI3* or *TSC1*, found in the GSEA gene set of GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_MACROAUTOPHAGY were not significantly affected. Genes involved in DNA repair mechanisms, such as *RAD54B* (p-value $\log(-10)=2.54$), were also significantly upregulated in OR cell lines. We classified genes for the GOBP_DNA_REPAIR pathway obtained from our GSEA analysis, based on the order of enrichment (Table 4 and Fig. 2c). Not all genes were impacted by the acquisition of the OR phenotype. Only *BRCC3* (p-value $\log(-10)=1.87$), *WRN* (p-value $\log(-10)=2.09$), *USP45* (p-value $\log(-10)=1.52$) and xeroderma pigmentosum complementation group A (*XPA*; p-value $\log(-10)=1.32$) were significantly upregulated. No pathways seemed significantly enriched in the 87 downregulated genes. Genes that were significantly downregulated included GRAM domain containing 4 (*GRAMD4*; p-value $\log(-10)=3.82$) following by H2A clustered histone 17 (*HIST1H2AM*; p-value $\log(-10)=3.03$) and Keratin associated protein 21-1 (*KRTAP21-1*; p-value $\log(-10)=2.66$). Overall, DNA repair mechanisms, autophagy but also apoptosis, cell cycle and mRNA processing may be involved in the acquisition of olaparib resistance in PC.

2.1.2.4. DISCUSSION

Mechanisms of PARPi antitumor activity and resistance are well described for breast and ovarian cancers. These inhibitors are also promising therapeutic agents to prolong life and ameliorate the response to hormono- and chemotherapies for PC patients. However, PARPi resistance is also a potential and expected risk that is not well understood in PC. In this study, we developed olaparib resistant PC cell models derived from PC cell lines LNCaP, C4-2B and DU145 to identify genes essential for acquired resistance. Our analysis showed that several pathways, such as DNA repair or autophagy, may regulate olaparib resistance.

Our GSEA overview analysis showed that DOUBLE_STRAND_BREAK_REPAIR and RECOMBINATIONAL_REPAIR were significantly enriched with a NES over 2.0. Genes from these pathways, such as *BRCC3*, *WRN*, *USP45* and *XPA*, were also found in our volcano plot analyses (Fig. 3b). *BRCC3* and *WRN* are known to play a role in HR and *USP45* and *XPA* in NER. Interestingly, these genes are linked to resistance to radio- and chemotherapies for cancer. Studies have shown that their expression is increased after treatment, inducing an increase in DNA repair and resulting in resistance to these treatments²⁰⁻²³. These results support the idea that PARPi-resistant cancer cells have altered DNA repair pathways, which may involve restoration of mutated HR pathway to overcome the cytotoxic effect of olaparib. NER have also been shown to affect the sensitivity profile to olaparib²⁴. However, the exact mechanism of resistance mediated by the NER is not well understood. It would be important to measure basal level of DNA repair mechanisms in these OR cell lines.

Interestingly, some upregulated genes found in RNA processing (*MAGOH*, *SCAF11* and *PLRG1*) have been shown to play a role in tumorigenesis and cancer aggressiveness in glioma, liver, and gastric cancers²⁵⁻²⁷. Upregulation of these genes may lead to an aberrant RNA splicing and promote splice-induced gene alterations, such as the Delta11q mutation on *BRCA1* gene²⁸. Some studies in breast cancer showed that targeting RNA splicing with an inhibitor, pladienolide B, reduced the occurrence of *BRCA1* mutations that promote acquired resistance in breast

cancer^{28,29}. A combination of this inhibitor and PARPi may help to limit the development of PARPi resistance.

Autophagy is now considered a resistance mechanism for PARPi^{15,30,31}. We previously reported that the basal level of autophagy can impact the sensitivity to olaparib in PC cell lines¹⁴. In the present study, upregulation of macroautophagy pathways was observed during our GSEA analyses and expression of the autophagy ATG2B gene was significantly increased (Table. 2). Upregulation of ATG2B expression has already been associated with an increased resistance to therapies such as sunitinib or imatinib, which induce DNA breaks^{32,33}. Notably, increased levels of autophagy permit cancer cells to repair DNA breaks more efficiently through the HR or BER pathways^{31,34,35}. Interestingly, *KIF5B* and *ARL3* found in PROTEIN_TRANSPORT_ALONG_MICROTUBULE play a role in the last step of autophagy, during the autophagic lysosome reformation (ALR)^{36,37}. This possible impact on ALR may lead to an increase of lysosome concentration in cancer cells, which has been shown to induce acquired resistance to CDK4/6 inhibitor in breast cancer³⁸. Based on these analyses, autophagy induction and termination may be important in the olaparib acquired resistance.

Many genes upregulated in the OR cells lines are important in cell cycle regulation (Fig. 3d). Among these genes, ROCK2 plays an essential role in G1/S phase transition and studies have shown that its depletion or inhibition leads to a cell cycle arrest, a senescent phenotype and a modification of senescence-associated secretory phenotype (SASP) composition^{39,40}. Olaparib is already known to induce a senescence-like phenotype in ovarian cancer cells which can contribute to tumor progression and acquired PARPi resistance^{41,42}. Increased ROCK2 expression may contribute to acquired olaparib resistance and targeting the protein with a ROCK inhibitor (ROCKi) as a senomorphic drug may limit induction of the senescence phenotype⁴³. Interestingly, the chemical structure of the ROCKi hydroxyfasudil contains the benzamide pharmacophore of PARPi and inhibits the activity of PARP1 and PARP2 by 27% and 50%, respectively⁴⁴. It is already known that senescent cells are resistant to apoptosis by decreasing expression of pro-apoptotic proteins and increasing expression of anti-apoptotic proteins⁴⁵. We identified two pro-apoptotic

genes, *GRAMD4* and sirtuin-3 (*SIRT3*), with decreased gene expression suggesting a possible negative regulation of apoptosis in our OR cell lines.

CDK12, upregulated in OR PC cell lines, may also be a promising target to reverse olaparib acquired resistance. This protein is known to regulate cell cycle and HR. Indeed, its inhibition reverses innate and acquired resistance to PARPi in breast cancer⁴⁶. Interestingly, CDK12 is mutated in 5 to 7% of patients with a metastatic castrate-resistant PC and it is included in the list of key DNA damage response genes in current clinical trials⁴⁷. It is possible that PC cancer cells induce new mutations on CDK12 to restore its expression and its activity to bypass PARPi effects. It would be of interest to combined CDK12 inhibitor and PARPi in OR PC cell lines to determine whether this combination can reverse the acquired resistance.

In conclusion, our study provides a set of PC cell lines with varying degrees of olaparib resistance to study acquired PARPi resistance in PC. Our microarray analysis showed that three major pathways, DNA repair, particularly for double-strand DNA breaks, autophagy and senescence were potentially upregulated in OR cell lines. Targeting identified genes from these pathways, such as *BRCC3*, *ATG2B* or *ROCK2*, may present an opportunity to reverse acquired resistance and reinforce the effect of PARPi.

2.1.2.5. METHODS

Cell culture and generation of OR cell lines

Human PC cell lines, LNCaP and DU145, were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA; ATCC CRL-174 and ATCC HTB- 81, respectively). C4-2B cell line was kindly gifted by Dr. Martin Gleave (Vancouver Prostate Centre, BC, Canada). All cell lines were verified by STR. Cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Wisent Inc., St-Bruno, QC, Canada; 350-000-EL) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 0.5 µg/mL amphotericin B (Wisent Inc., 450-105-QL), and 50 µg/mL gentamicin (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA; 15710064). All cells were grown in 5% CO₂ at 37°C. OR cells derived from LNCaP, C4-2B and DU145 were obtained by culturing parental cell lines in increasing concentrations (0.5 to 30 µM) of olaparib (Selleckchem, Conshohocken, PA, USA; AZD2281) for 6 months. Doubling time and cell morphology were determined using the IncuCyte™ Live-Cell Imaging System (Essen BioScience, Inc., Ann Arbor, MI, USA).

Clonogenic assay

C4-2B WT/-OR and DU145 WT/-OR were seeded at 500 cells/well and LNCaP WT/-OR were seeded at 1,000 cells/well in 6-well in 5% CO₂ at 37°C. Medium was removed and replaced with RPMI complete medium containing olaparib (0.00125 µM to 40 µM). After 7 days of treatment, cells were fixed with methanol and stained with a solution of 50% (v/v) methanol and 0.5% (m/v) blue methylene (Sigma-Aldrich Inc., Saint-Louis, MO, USA). Colonies were counted under a stereomicroscope and reported as a percentage of the control. IC₅₀ values were determined using Graph Pad Prism 9 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Each experiment was performed in duplicate and repeated three times.

Protein preparation and Western blot analysis

Proteins were extracted from cell lines using mammalian protein extraction reagent (MPER; 50 nM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 0.25% Triton 100X, and 10% glycerol) containing a protease and phosphatase inhibitor cocktail (ThermoFisher, Waltham, MA, USA; PIA32961). Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA; 500-0006). Twenty micrograms of total protein extract were separated in precast 4-15% gradient Tris-

glycine SDS-polyacrylamide gels (Mini-PROTEAN® TGXTM Precast Gels, Bio-Rad, 456-1086) and transferred onto Trans-Blot Turbo Mini 0.2 µm nitrocellulose membranes (Bio-Rad, 170-4159). Membranes were blocked with 5% milk in PBS-Tween for 1 hour and probed with primary antibodies overnight at 4°C with agitation in PBS-Tween 0.01%. The following primary antibodies were used in this study: β-Actin (AC14) (abcam, Cambridge, UK; AB6276, 1:20000 dilution), PARP1 (Proteintech, Rosemont, IL, USA; 66250, 1:650 dilution) and PAR/pADR (R&D systems, Minneapolis, MN, USA; 4335-MC-100, 1:1000 dilution). Primary antibodies were detected with peroxidase-conjugated secondary antibodies including goat anti-mouse (Millipore, Burlington, MA, USA; AP124P, 1:4000 dilution), goat anti-rabbit (Millipore, AP156P, 1:10000 dilution) and rabbit anti-goat (Millipore, AP106P, 1/4000 dilution), and enhanced with chemiluminescence (Millipore, RPN2232) detected using the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Actin was used as a loading protein control. Each experiment was repeated three times. Image J⁴⁸ was used to quantify protein levels in Western blots.

RNA preparation and microarray analysis of gene expression

RNA from WT and OR cell lines (LNCaP, C4-2B and DU145) was extracted as described previously⁴⁹. Gene expression microarray experiments were performed at the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre (genomequebec.mcgill.ca) using human-Clariom S arrays (Affymetrix®). Data were analyzed using Transcriptome Analysis Console (Affymetrix®). To determine enriched pathways, GSEA analysis was performed using the GSEA 4.2.1 software (Broad Institute, Harvard, UK). Gene Ontology Biological Process (GOBP) was used as the gene set database, and signal-to-noise ratio was selected for ranking genes metric parameters. Bubble charts were created using the R software and ggplot2 extension⁵⁰. Volcano plots were created using the web app VolcanoR⁵¹. Downregulated genes with a fold change(log2) ≤ -0.6 and upregulated genes with a fold change(log2) ≥ +0.6 with a significant (log-10) q-value ≥ 1.3 were used as cut-offs for the study. Genes included in these thresholds were visualized by creating a heatmap using Heatmapper⁵².

Statistics

Statistical analyses in Fig. 1 were performed using Graph Pad Prism 9 (GraphPad Software Inc.) using the two-tail Student t-test, which was justified appropriately for every experimental design. The data were normally distributed and the variance between groups that were compared was similar. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant. FDR q-value was automatically calculated during the GSEA analysis.

2.1.2.6. ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge Dr. Saad and Dr. Mes-Masson laboratory members for their helpful comments and discussion. We thank Dr. Carmona and Alexandre Sauriol for their help in microarray analyses. Dr. Gleave (Vancouver Prostate Centre) for the C4-2B cell line. We also thank Jacqueline Chung for manuscript editing.

2.1.2.7. CONFLICTS OF INTEREST

F.S. is an advisory board member (personal) and has received research funding (institutional) from AstraZeneca, Pfizer, Astellas, Bayer and Janssen.

2.1.2.8. AUTHOR CONTRIBUTION STATEMENT

M.C., B.P., A.M.M.M., and F.S. conceived and designed the experiments. M.C. conducted the experiments and analysis. B.P., A.M.M.M., and F.S. supervised the project. M.C., B.P., A. M.M.M., and F.S. wrote the paper.

2.1.2.9. FUNDING

This work was supported by the Raymond Garneau Chair in Prostate Cancer Research of the Université de Montréal (F.S.) and by research grants from the Canadian Urological Association. M.C received studentships from Canderel/ICM, and the Département de biologie moléculaire de l'Université de Montréal.

3.1.1.1. REFERENCES

- 1 Mateo, J. *et al.* DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med* **373**, 1697-1708, doi:10.1056/NEJMoa1506859 (2015).
- 2 Robinson, D. *et al.* Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* **161**, 1215-1228, doi:10.1016/j.cell.2015.05.001 (2015).
- 3 Saad, F. *et al.* Emerging therapeutic targets for patients with advanced prostate cancer. *Cancer Treat Rev* **76**, 1-9, doi:10.1016/j.ctrv.2019.03.002 (2019).
- 4 de Bono, J. *et al.* Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* **382**, 2091-2102, doi:10.1056/NEJMoa1911440 (2020).
- 5 Clarke, N. *et al.* Olaparib combined with abiraterone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind, placebo- controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **19**, 975-986, doi:10.1016/S1470- 2045(18)30365-6 (2018).
- 6 Bryant, H. E. *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**, 913-917, doi:10.1038/nature03443 (2005).
- 7 Jagtap, P. G. *et al.* Discovery of potent poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors from the modification of indeno[1,2-c]isoquinolinone. *J Med Chem* **48**, 5100-5103, doi:10.1021/jm0502891 (2005).
- 8 Kim, D. S., Camacho, C. V. & Kraus, W. L. Alternate therapeutic pathways for PARP inhibitors and potential mechanisms of resistance. *Exp Mol Med* **53**, 42-51, doi:10.1038/s12276-021-00557-3 (2021).
- 9 Genta, S., Martorana, F., Stathis, A. & Colombo, I. Targeting the DNA damage response: PARP inhibitors and new perspectives in the landscape of cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* **168**, 103539, doi:10.1016/j.critrevonc.2021.103539 (2021).

- 10 Norquist, B. *et al.* Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas. *J Clin Oncol* **29**, 3008- 3015, doi:10.1200/JCO.2010.34.2980 (2011).
- 11 Pettitt, S. J. *et al.* Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance. *Nature communications* **9**, 1849, doi:10.1038/s41467-018-03917-2 (2018).
- 12 Du, Y. *et al.* Blocking c-Met-mediated PARP1 phosphorylation enhances anti- tumor effects of PARP inhibitors. *Nat Med* **22**, 194-201, doi:10.1038/nm.4032 (2016).
- 13 Rondinelli, B. *et al.* EZH2 promotes degradation of stalled replication forks by recruiting MUS81 through histone H3 trimethylation. *Nat Cell Biol* **19**, 1371-1378, doi:10.1038/ncb3626 (2017).
- 14 Cahuzac, M. *et al.* Pre-activation of autophagy impacts response to olaparib in prostate cancer cells. *Communications Biology* **5**, 251, doi:10.1038/s42003-022- 03210-5 (2022).
- 15 Liu, Y. *et al.* Targeting autophagy potentiates the anti-tumor effect of PARP inhibitor in pediatric chronic myeloid leukemia. *AMB Express* **9**, 108, doi:10.1186/s13568-019-0836-z (2019).
- 16 Zai, W. *et al.* Targeting PARP and autophagy evoked synergistic lethality in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **41**, 345-357, doi:10.1093/carcin/bgz104 (2020).
- 17 Min, A. & Im, S. A. PARP Inhibitors as Therapeutics: Beyond Modulation of PARylation. *Cancers (Basel)* **12**, doi:10.3390/cancers12020394 (2020).
- 18 Gogola, E. *et al.* Selective Loss of PARG Restores PARylation and Counteracts PARP Inhibitor-Mediated Synthetic Lethality. *Cancer Cell* **33**, 1078-1093 e1012, doi:10.1016/j.ccell.2018.05.008 (2018).
- 19 Chen, S. H. & Yu, X. Targeting dePARylation selectively suppresses DNA repair- defective and PARP inhibitor-resistant malignancies. *Sci Adv* **5**, eaav4340, doi:10.1126/sciadv.aav4340 (2019).

- 20 Cierna, Z. *et al.* Increased levels of XPA might be the basis of cisplatin resistance in germ cell tumours. *BMC Cancer* **20**, 17, doi:10.1186/s12885-019-6496-1 (2020).
- 21 Tu, Z. *et al.* BRCC3 acts as a prognostic marker in nasopharyngeal carcinoma patients treated with radiotherapy and mediates radiation resistance in vitro. *Radiat Oncol* **10**, 123, doi:10.1186/s13014-015-0427-3 (2015).
- 22 Pajuelo-Lozano, N. *et al.* XPA, XPC, and XPD Modulate Sensitivity in Gastric Cisplatin Resistance Cancer Cells. *Front Pharmacol* **9**, 1197, doi:10.3389/fphar.2018.01197 (2018).
- 23 Futami, K. & Furuichi, Y. RECQL1 and WRN DNA repair helicases: potential therapeutic targets and proliferative markers against cancers. *Front Genet* **5**, 441, doi:10.3389/fgene.2014.00441 (2014).
- 24 Daemen, A. *et al.* Cross-platform pathway-based analysis identifies markers of response to the PARP inhibitor olaparib. *Breast Cancer Res Treat* **135**, 505-517, doi:10.1007/s10549-012-2188-0 (2012).
- 25 Chen, P., Li, Y., Li, N., Shen, L. & Li, Z. Comprehensive Analysis of Pyroptosis- Associated in Molecular Classification, Immunity and Prognostic of Glioma. *Front Genet* **12**, 781538, doi:10.3389/fgene.2021.781538 (2021).
- 26 Liu, Z. *et al.* RNA helicase DHX37 facilitates liver cancer progression by cooperating with PLRG1 to drive super enhancer-mediated transcription of cyclin D1. *Cancer research*, doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-3038 (2022).
- 27 Zhou, Y. *et al.* MAGOH/MAGOHB Inhibits the Tumorigenesis of Gastric Cancer via Inactivation of b-RAF/MEK/ERK Signaling. *Onco Targets Ther* **13**, 12723-12735, doi:10.2147/OTT.S263913 (2020).

- 28 Pederiva, C., Bohm, S., Julner, A. & Farnebo, M. Splicing controls the ubiquitin response during DNA double-strand break repair. *Cell Death Differ* **23**, 1648-1657, doi:10.1038/cdd.2016.58 (2016).
- 29 Wang, Y. *et al.* The BRCA1-Delta11q Alternative Splice Isoform Bypasses Germline Mutations and Promotes Therapeutic Resistance to PARP Inhibition and Cisplatin. *Cancer research* **76**, 2778-2790, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0186 (2016).
- 30 Arun, B., Akar, U., Gutierrez-Barrera, A. M., Hortobagyi, G. N. & Ozpolat, B. The PARP inhibitor AZD2281 (Olaparib) induces autophagy/mitophagy in BRCA1 and BRCA2 mutant breast cancer cells. *Int J Oncol* **47**, 262-268, doi:10.3892/ijo.2015.3003 (2015).
- 31 Pai Bellare, G., Saha, B. & Patro, B. S. Targeting autophagy reverses de novo resistance in homologous recombination repair proficient breast cancers to PARP inhibition. *Br J Cancer* **124**, 1260-1274, doi:10.1038/s41416-020-01238-0 (2021).
- 32 Gao, S., Wang, K. & Wang, X. miR-375 targeting autophagy-related 2B (ATG2B) suppresses autophagy and tumorigenesis in cisplatin-resistant osteosarcoma cells. *Neoplasma* **67**, 724-734, doi:10.4149/neo_2020_190423N366 (2020).
- 33 Zhang, J. *et al.* LncRNA-HOTAIR activates autophagy and promotes the imatinib resistance of gastrointestinal stromal tumor cells through a mechanism involving the miR-130a/ATG2B pathway. *Cell Death Dis* **12**, 367, doi:10.1038/s41419-021-03650-7 (2021).
- 34 Czarny, P., Pawlowska, E., Bialkowska-Warzecha, J., Kaarniranta, K. & Blasiak, J. Autophagy in DNA damage response. *Int J Mol Sci* **16**, 2641-2662, doi:10.3390/ijms16022641 (2015).
- 35 Hewitt, G. *et al.* SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair. *Autophagy* **12**, 1917-1930, doi:10.1080/15548627.2016.1210368 (2016).

- 36 Cardoso, C. M. *et al.* Depletion of kinesin 5B affects lysosomal distribution and stability and induces peri-nuclear accumulation of autophagosomes in cancer cells. *PLoS One* **4**, e4424, doi:10.1371/journal.pone.0004424 (2009).
- 37 Chen, Y. & Yu, L. Development of Research into Autophagic Lysosome Reformation. *Mol Cells* **41**, 45-49, doi:10.14348/molcells.2018.2265 (2018).
- 38 Fassl, A. *et al.* Increased lysosomal biomass is responsible for the resistance of triple-negative breast cancers to CDK4/6 inhibition. *Sci Adv* **6**, eabb2210, doi:10.1126/sciadv.abb2210 (2020).
- 39 Simay Demir, Y. D., Ozdemir, A., Sularli, C., Benhur, E. & Ark, M. The implication of ROCK 2 as a potential senotherapeutic target via the suppression of the harmful effects of the SASP: Do senescent cancer cells really engulf the other cells? *Cell Signal* **84**, 110007, doi:10.1016/j.cellsig.2021.110007 (2021).
- 40 Kumper, S. *et al.* Rho-associated kinase (ROCK) function is essential for cell cycle progression, senescence and tumorigenesis. *Elife* **5**, e12994, doi:10.7554/eLife.12203 (2016).
- 41 Fleury, H. *et al.* Exploiting interconnected synthetic lethal interactions between PARP inhibition and cancer cell reversible senescence. *Nature communications* **10**, 2556, doi:10.1038/s41467-019-10460-1 (2019).
- 42 Wang, Z., Gao, J., Zhou, J., Liu, H. & Xu, C. Olaparib induced senescence under P16 or P53 dependent manner in ovarian cancer. *J Gynecol Oncol* **30**, e26, doi:10.3802/jgo.2019.30.e26 (2019).
- 43 Mongelli, A. *et al.* Treating Senescence like Cancer: Novel Perspectives in Senotherapy of Chronic Diseases. *Int J Mol Sci* **21**, doi:10.3390/ijms21217984 (2020).
- 44 Antolin, A. A. & Mestres, J. Dual Inhibitors of PARPs and ROCKs. *ACS Omega* **3**, 12707-12712, doi:10.1021/acsomega.8b02337 (2018).

- 45 Hu, L. *et al.* Why Senescent Cells Are Resistant to Apoptosis: An Insight for Senolytic Development. *Front Cell Dev Biol* **10**, 822816, doi:10.3389/fcell.2022.822816 (2022).
- 46 Johnson, S. F. *et al.* CDK12 Inhibition Reverses De Novo and Acquired PARP Inhibitor Resistance in BRCA Wild-Type and Mutated Models of Triple-Negative Breast Cancer. *Cell reports* **17**, 2367-2381, doi:10.1016/j.celrep.2016.10.077 (2016).
- 47 Antonarakis, E. S. Cyclin-Dependent Kinase 12, Immunity, and Prostate Cancer. *N Engl J Med* **379**, 1087-1089, doi:10.1056/NEJMcibr1808772 (2018).
- 48 Fleury, H. *et al.* Cumulative defects in DNA repair pathways drive the PARP inhibitor response in high-grade serous epithelial ovarian cancer cell lines. *Oncotarget* **8**, 40152-40168, doi:10.18632/oncotarget.10308 (2017).
- 49 Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671-675, doi:10.1038/nmeth.2089 (2012).
- 50 Wickham, H., Sievert, C. & SpringerLink. Ggplot2 : elegant graphics for data analysis. 1 online resource. (2016).
- 51 Goedhart, J. & Luijsterburg, M. S. VolcanoR – a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots. *bioRxiv*, 2020.2005.2007.082263, doi:10.1101/2020.05.07.082263 (2020).
- 52 Babicki, S. *et al.* Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res* **44**, W147-153, doi:10.1093/nar/gkw419 (2016).

3.1.1.2. TABLES

Table 1: Comparison of IC₅₀ values for olaparib between PC wild-type (WT) and olaparib-resistant (OR) cell lines

Cell lines	Olaparib (μM)		<i>p</i> -value
	WT	OR	
LNCaP	0.12 ± 0.084	0.53 ± 0.11	<i>p</i> =0.050
C4-2B	0.027 ± 0.018	0.78 ± 0.021	<i>p</i> =0.024
DU145	7.7 ± 0.48	29 ± 4.27	<i>p</i> =0.0080

Table 2: Top 20 genes upregulated in OR vs. WT PC cell lines

Name	Gene ID	Fold change (log2)	Significance (log-10)
MYPOP	339344	0.626066733	3.260994375
SURF1	6834	0.971457809	3.133881885
TAS2R31	259290	1.594891664	3.03187479
ROCK2	9475	1.814688581	3.017431335
EML5	161436	0.812352557	2.921011236
ZNF813	126017	1.27017308	2.90592896
PLRG1	5356	0.922899822	2.890174563
BHLHB9	80823	0.881211264	2.819600492
ANKRD26	22825	1.316471381	2.743111191
RANBP1	19385	1.050488081	2.678150499
ATG2B	76559	1.654462509	2.65188022
SYNJ1	8867	1.01210112	2.616349744
RAD54B	25788	1.309476495	2.543401448
CAPN14	440854	0.654425569	2.501443269
PIK3R4	30849	0.699793454	2.40793807
ZNF611	81856	0.765653399	2.369207217
CD79B	974	0.967579395	2.353033565
KRTAP4-8	728224	0.716777677	2.350183007
RPE	6120	1.061135427	2.324523647
TRIM59	286827	1.124953072	2.305366711

Table 3: Top 20 genes downregulated in OR vs. WT PC cell lines

Name	Gene ID	Fold change (log2)	Significance (log-10)
GRAMD4	23151	-1.455448484	3.820213521
HIST1H2AM	8336	-1.079845354	3.038011837
KRTAP21-1	337977	-0.678567648	2.665150232
SERTAD3	29946	-1.090577359	2.553145699
DDAH2	23564	-1.328818688	2.356539512
LTBR	4055	-1.102550246	2.295431085
CCDC92	80212	-1.533187243	2.290609924
LOC100133669	100133669	-0.628676373	2.272973507
PTK6	5753	-0.604035851	2.143741754
ZNF705B	100132396	-0.705444211	2.081909321
SLC6A12	6539	-0.939695006	2.068809797
ENPP2	5168	-0.681866615	2.061059338
LNP1	348801	-0.899081921	2.05980048
ACHE	43	-0.756301787	2.059638325
SLC35C2	51006	-1.040655038	2.03265381
NUDT18	79873	-1.468949749	2.018578713
TMEM74	157753	-0.697450193	2.015048192
INAFM1	100688014	-1.31761451	2.011847558
TRPV4	63873	-0.632871399	1.991633619
ARFRP1	76688	-0.800853082	1.98658451

Table 4: Top 10 genes that were enriched in the GSEA gene set for DNA repair

Name	Gene ID	Change	Fold change (log2)	Significance (log-10)
BRCC3	79184	Increased	1.17524346372176	1.86861052936291
WRN	7486	Increased	1.3897294100393	2.09404094346967
USP45	85015	Increased	2.16059849815779	1.51924844116418
XPA	395659	Increased	1.31482769069977	1.33272962036067
XPC	22591	Unchanged	1.27263828634861	1.15306119992332
VCPIP1	428359	Unchanged	0.776414270017991	1.28055627682958
PRKDC	5591	Unchanged	2.44036683749613	1.09824709135632
MBD4	17193	Unchanged	1.0822056611492	1.25074003757324
RAD18	56853	Unchanged	1.12222858709984	1.29614400190726
PRIMPOL	201973	Unchanged	1.27599396704602	1.06890196790282

3.1.1.3. FIGURE

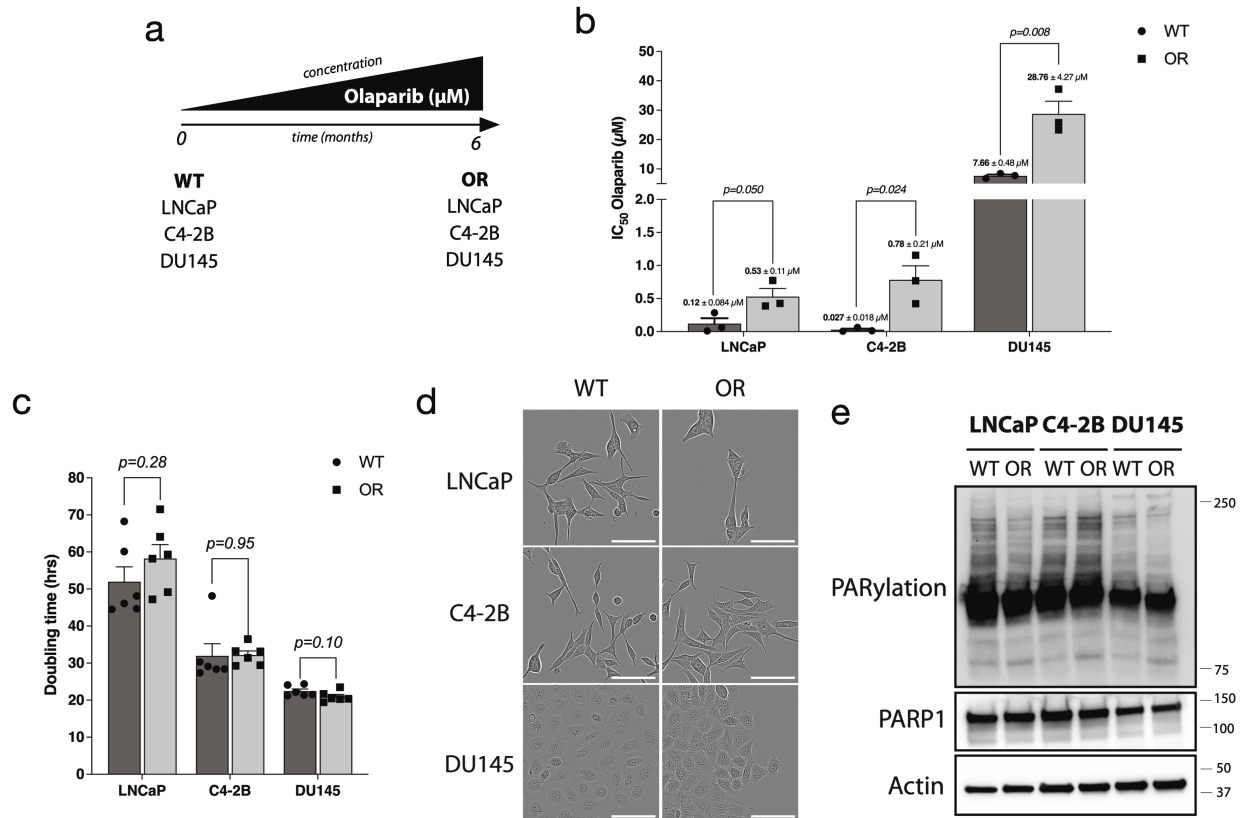


Figure 1: Development of prostate cancer cell lines resistant to olaparib (OR) from parental cell lines. (a). Schematic representation of OR PC cell lines development. **(b).** Olaparib IC_{50} of PC WT and OR cell lines. **(c).** Doubling time of WT and OR cell lines. **(d).** Representative images of WT and OR cell morphology after 4 days of culture. **(e).** PARP1 expression and PARylation activity measured by Western blot on whole cell extracts from WT and OR PC cell lines. Actin was used as loading control.

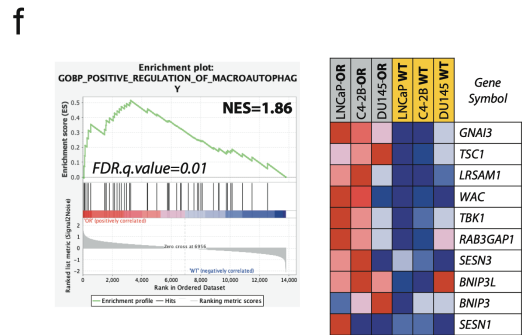
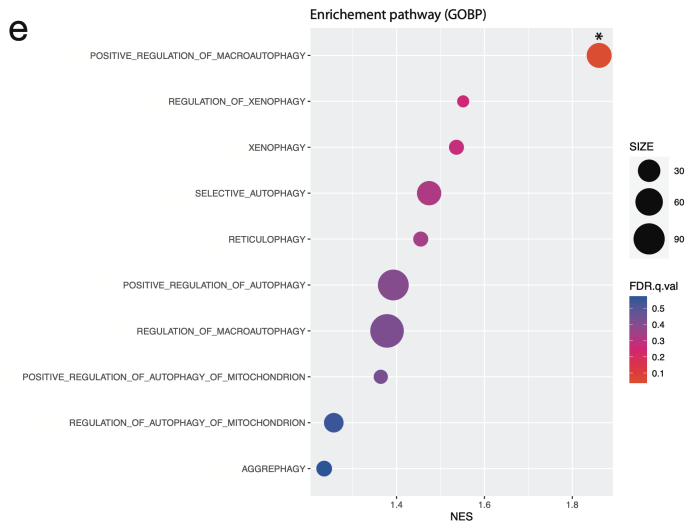
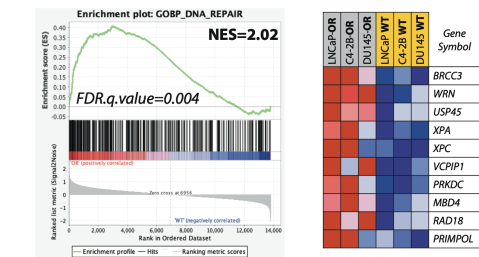
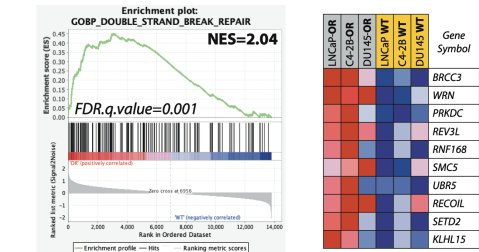
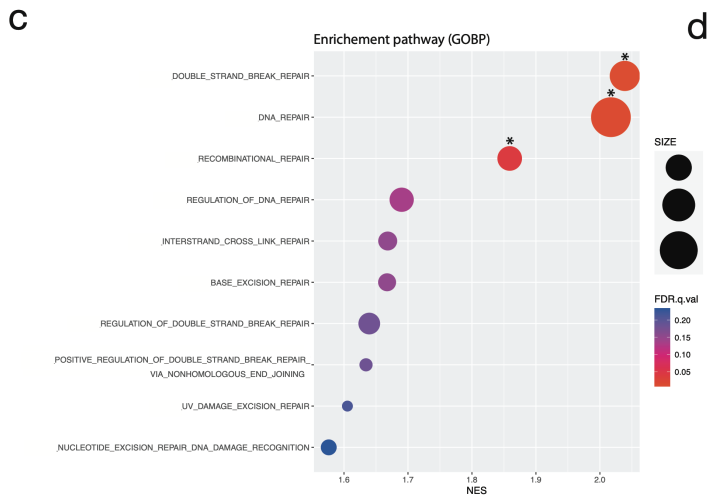
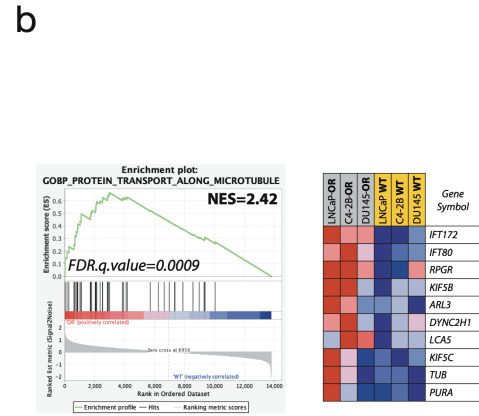
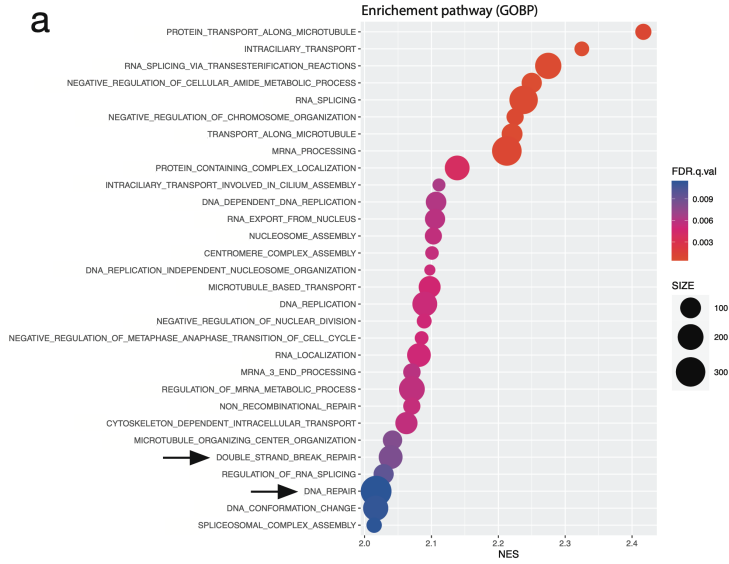


Figure 2: Enrichment pathways in PC OR cell lines. (a). Bubble chart regrouping the 30 most significantly enriched pathways determined by GSEA analysis. **(b)** Enrichment plot and top 10 enriched genes in the PROTEIN_TRANSPORT_ALONG_MICROTUBULES. **(c)** Bubble chart derived from the initial analysis (a) and regrouping the top 10 enrichment pathways linked to DNA repair mechanisms. **(d)** Enrichment plot and top 10 enriched genes of DOUBLE_STRAND_BREAK_REPAIR and DNA_REPAIR pathways. **(e)** Bubble chart derived from the initial analysis in (a) and regrouping the top 10 enrichment pathways linked to autophagy mechanisms. **(f)** Enrichment plot and top 10 enriched genes of POSITIVE_REGULATION_OF_MACROAUTOPHAGY pathway.

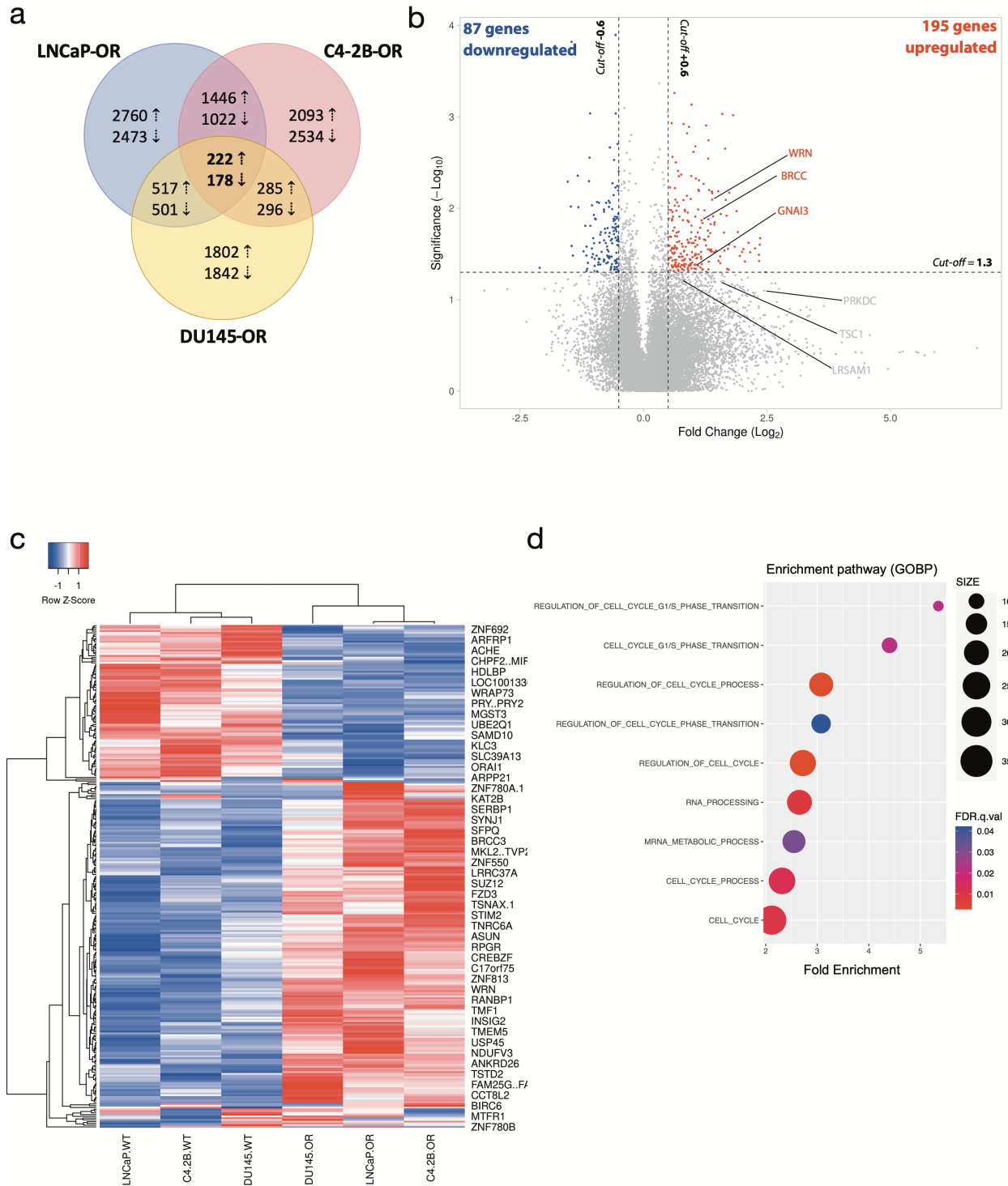


Figure 3: Determination of the most upregulated and downregulated genes in all three OR PC cell lines. (a) Venn diagram representing all genes which were upregulated (222) and downregulated (178) in all OR cell lines comparing to all WT cell lines. **(b)** Volcano plot with fold change(log2) ≤ -0.6 and with a fold change(log2) $\geq +0.6$ as thresholds for gene expression, and

(log₁₀) q-value ≥ 1.3 as threshold for statistically significant variation of expression. 198 upregulated (red) and 98 downregulated (blue) genes were identified using these thresholds. **(c)** Heatmap showing all significant upregulated genes in red and all significant downregulated genes in blue. **(d)**. Bubble chart regrouping all pathways significantly enriched in the list of upregulated genes.

Chapitre 3 – DISCUSSION

1. L'autophagie dans la résistance innée à l'olaparib dans le cancer de la prostate

L'autophagie étant désormais acceptée comme un mécanisme de résistance multidroque, elle est de plus en plus ciblée pour améliorer l'efficacité des traitements. Notre première étude a permis de mettre en évidence que l'autophagie joue un rôle dans la résistance innée des lignées cellulaires du CP à l'olaparib (250). Cette résistance médiée par l'autophagie semble être régulée par la localisation nucléaire de la protéine SQSTM1/p62 qui peut mener à la dégradation de FLNA et donc diminuer l'efficacité de HR (Figure 9). Ces résultats amènent à devoir prendre en considération la question de l'importance du niveau d'autophagie chez un patient avant un traitement avec un agent thérapeutique afin d'augmenter son efficacité.

Nous avons décidé de nous concentrer sur l'olaparib principalement à la vue des résultats préliminaires obtenus lors des essais cliniques. En effet, pour le moment l'olaparib est le seul PARPi à avoir un effet bénéfique sur la survie des patients. L'étude du rôle de l'autophagie dans la résistance innée pourrait être étendue à d'autres PARPi comme le niraparib ou encore le talazoparib. Nous pensons que des résultats similaires seront obtenus pour ces inhibiteurs, en particulier les autres PARPi.

Peu de travaux ont été publiés ces dernières années mettant en avant l'importance du niveau basal de l'autophagie dans la réponse thérapeutique (251-253). La majorité des études disponibles dans la littérature se basent uniquement sur l'impact des traitements thérapeutiques sur l'activation de l'autophagie et non l'inverse (121, 202, 211, 254). De plus, celles-ci ont aussi démontré que cibler spécifiquement ce mécanisme autophagique augmentait l'efficacité de ces traitements. Nous avons observé un effet similaire dans nos modèles de lignées cellulaires du cancer de la prostate (LNCaP, C4-2B et PC-3) dépourvus d'autophagie où une sensibilité plus importante à l'olaparib a été observée. Cette différence était moins élevée dans les lignées PC-3

comparativement aux LNCaP et C4-2B. Celle-ci peut s'expliquer par l'absence de mutations au niveau des gènes de réponse aux dommages à l'ADN. Effectivement, contrairement aux LNCaP et C4-2B, qui ont une délétion hétérozygote de BRCA2, les PC-3 n'ont aucune mutations sur le gène (255). Une étude parue en 2014 a mis en avant que les lignées cellulaires ayant des mutations sur les gènes BRCA1/2 étaient plus dépendantes de l'autophagie lors de stress induits par les traitements thérapeutiques (256).

Afin d'appuyer l'importance du niveau basal d'autophagie, nous avons décidé d'utiliser la rapamycine, inhibiteur de mTOR, pour l'activer avant et après le traitement à l'olaparib. Ces deux schémas de traitement semblent induire l'autophagie à des niveaux similaires au vu de l'expression de la protéine LC3-II obtenue. Ceci nous permet d'affirmer que les effets observés tout au long de notre étude sont dus à la pré-activation autophagique et non à un niveau d'induction différent entre les conditions RO10 et O10R. Cette pré-activation mène à un effet protecteur contre l'olaparib, qui est perdu lorsque l'autophagie est inhibée dans les lignées KO. Ceci indique que cette protection est induite par l'autophagie et non par des cibles non spécifiques de la rapamycine. La réintroduction de l'autophagie dans les lignées KO concomitante à la restauration de cet effet protecteur dans ces cellules, appuient aussi cette hypothèse. Ce phénotype induit par la rapamycine peut paraître étonnant sachant que plusieurs études ont montré que l'inhibition de mTOR augmente la sensibilité à la radiothérapie mais aussi à l'olaparib de plusieurs types de cancer (257-261). Cette différence d'effet peut s'expliquer par le traitement séquentiel que nous avons réalisé. En effet, ces études utilisent la rapamycine en même temps, ou après l'induction des cassures double brin de l'ADN, ne prenant donc pas en compte l'impact de l'activation de l'autophagie en amont. Ces résultats observés dans la littérature correspondent en pratique à notre condition O10R, où une diminution de la prolifération cellulaire non significative et peu d'effet sur l'efficacité de la HR ont été observés dans nos lignées de CP. D'autres activateurs d'autophagie, ne ciblant pas mTOR, comme les activateurs d'AMPK comme la metformine ou encore le resvératrol pourraient être utilisés pour confirmer cet effet protecteur de la pré-activation autophagique. De plus, la validation de cette protection et de son inhibition en ciblant l'autophagie devrait être aussi effectuée dans un modèle *in vivo*. Une combinaison

d'HCQ et d'olaparib pourrait être testée sur des xénogreffes développées à partir de lignées cellulaires, comme les PC-3, avec un haut niveau basal d'autophagie.

Même s'il est désormais connu que l'autophagie est capable d'affecter certains mécanismes de réparation de l'ADN, aucune étude n'a précédemment démontré que cet effet pouvait avoir une incidence sur la sensibilité aux PARPi. Pour valider ce point, nous avons déterminé l'impact de la perte d'autophagie sur la réparation des cassures double brin de l'ADN dans les lignées cellulaires du CP. Nous avons observé dans nos expériences que la déplétion de l'autophagie réduisait l'efficacité de la HR. Néanmoins, le nombre de cassures double brin induites par l'irradiation diminuait dans les lignées de CP KO *Atg16L1* au cours du temps, sous-entendant que ces cellules étaient capables de les réparer malgré la forte réduction de l'activité de la HR. Plusieurs études ont suggéré que les cellules dépourvues d'autophagie devenaient dépendantes du système NHEJ pour réparer leurs cassures (123, 262). Ce système favorisant l'apparition d'erreurs lors de la réparation, les cellules dépourvues d'autophagie accumulent des cassures les rendant ainsi plus instables génétiquement. Cette dépendance au NHEJ serait une cible thérapeutique complémentaire idéale pour empêcher les cellules cancéreuses, dépourvues de la HR, de réparer leur ADN et donc d'induire plus efficacement leur mort. Dans notre cas, ce ciblage du NHEJ pourrait améliorer la sensibilité des lignées PC-3 KO *Atg16L1*, où une diminution moins marquée de leur IC50 à l'olaparib a été observée. Par exemple, des inhibiteurs de DNA-PKcs comme le NU7026 pourraient être utilisés (263).

Sachant que l'olaparib est connu pour induire un phénotype de sénescence caractérisé entre autres par une augmentation de la taille cellulaire et de l'activité de la *SA-beta-galactosidase* (SA-B-Gal), nous avons évalué ces deux paramètres (Annexe, Figure 10). Nous avons observé qu'une pré-activation de l'autophagie menait à une diminution du grossissement de la taille cellulaire ainsi que de l'activité SA-B-Gal, induit par le traitement à l'olaparib. Ces résultats ne sont pas étonnants puisque nous avons démontré dans notre étude que cette pré-activation de l'autophagie permettait aux cellules cancéreuses prostatiques de réparer plus efficacement les cassures double brin induites par l'olaparib. De plus, une étude parue en 2017 de l'équipe de Dre.

Perez a mis en avant qu'un traitement à la rapamycine pouvait diminuer le phénotype de sénescence en affectant le facteur de transcription *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2), voie pouvant être régulée par SQSTM1/p62, dans les fibroblastes de souris (264).

Nous avons donc décidé de nous intéresser à la protéine SQSTM1/p62 au vu de son accumulation dans nos lignées PC KO *Atg16L1* et de son rôle dans les mécanismes de réparation de l'ADN, en particulier le HR. Les résultats obtenus lorsque l'autophagie était pré-activée dans les lignées WT semblent concorder avec l'étude de Dr. Hewitt publiée en 2016 mettant en avant pour la première fois qu'une diminution de la concentration nucléaire de SQSTM1/p62 entraîne une inhibition de la dégradation de FLNA par le protéasome (231). Étonnamment, la déplétion de l'autophagie semble induire une légère augmentation de la localisation nucléaire de SQSTM1/p62, et donc un effet mineur sur l'expression de FLNA. Il semblerait que cette légère diminution de FLNA affecte quand même les recrutements de BRCA1 et Rad51 et ainsi l'efficacité de la HR. Une analyse de l'expression de la protéine *exportine 1* (XPO1), essentielle dans pour le transport nucléaire de SQSTM1/p62, serait intéressant à effectuer afin de déterminer comment la déplétion de l'autophagie peut affecter ce transport (265). L'importance de la protéine SQSTM1/p62 a aussi été confirmée avec l'utilisation du siARN où un effet protecteur à l'olaparib a été observée dans les lignées WT mais aussi KO dépourvues d'autophagie. En plus d'interagir avec FLNA, SQSTM1/p62 peut aussi réguler les mécanismes de réparation de l'ADN en inhibant l'E3 ubiquitine ligase RNF168 (239). L'étude publiée en 2016 par l'équipe de Dr. Zhao a mis en avant qu'une accumulation de SQSTM1/p62 dans le noyau menait à une diminution de l'activité de RNF168 pour la formation de chaînes poly-ubiquitinées sur l'histone H2AX réduisant ainsi le recrutement des acteurs de la HR. Il serait donc intéressant d'aller vérifier comment RNF168 est affectée dans notre étude. Outre son rôle dans l'autophagie, SQSTM1/p62 a plusieurs domaines d'interaction affectant d'autres voies moléculaires. C'est le cas par exemple de son domaine KIR, interagissant avec *kelch like ECH associated protein 1* (Keap1) dans la voie Nrf2, ou de son domaine TB, interagissant avec *tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6* (TRAF6) dans la voie *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) (266, 267). L'activation de Keap1 permet la translocation du facteur de transcription Nrf2 au noyau afin d'induire l'expression de gènes

importants pour le protéasome et la résolution des stress oxydatifs (268, 269). Récemment, une étude parue en 2020 a découvert que Nrf2 pouvait activer ATR lors de la réparation des cassures double brin induites par une irradiation (270). Quant à la voie NF- κ B, celle-ci joue principalement dans la réponse immunitaire, inflammatoire mais aussi dans l'inhibition de la voie apoptotique (271). Comme pour la voie de Nrf2, NF- κ B peut aussi réguler les mécanismes de réparation de l'ADN, en particulier le HR, en stabilisant par exemple le recrutement de BRCA1 aux sites de cassures (272). Il serait donc pertinent de vérifier l'impact de ces voies dans la résistance médiée par l'autophagie que nous avons observé dans notre étude. Même si nos résultats nous amènent à penser que SQSTM1/p62 est essentielle dans la résistance innée à l'olaparib, l'autophagie peut aussi réguler la réparation de l'ADN via la dégradation des protéines KAP1 et HP1 α interférant dans l'efficacité de la HR (235, 237). Il est donc possible qu'une certaine proportion de ces dégradations influencent le phénotype que nous avons observé. Une étude plus poussée sur celles-ci pourrait être réalisée pour confirmer ou non leur importance.

Nous n'excluons pas non plus les autres mécanismes régulant la résistance médiée par l'autophagie, comme celui du transport de l'olaparib à l'extérieur de la cellule (Figure 9). En effet, deux études publiées respectivement en 2019 et 2021 ont décrit que le transporteur ABCB1 influençait la disponibilité intracellulaire de l'olaparib dans les lignées du cancer de la prostate et de l'ovaire (273-275). L'équipe de Dr. Mishra a découvert que l'autophagie était justement capable d'affecter l'expression de ce transporteur (274). De ce fait, une mesure d'expression de certains transporteurs ABC et de la concentration intracellulaire et extracellulaire d'olaparib par spectrométrie de masse pourraient être réalisées. Ces nouvelles données pourraient être aussi complétées par l'évaluation de la capacité des lysosomes à piéger l'olaparib et ainsi diminuer sa disponibilité dans la cellule.

Notre étude est centrée sur l'autophagie canonique car les lignées cellulaires utilisées expriment l'ensemble des acteurs autophagiques. Il serait intéressant de caractériser le rôle de l'autophagie non-canonique dans la résistance innée médiée par l'autophagie. Nous avons noté que les DU145, utilisées dans notre deuxième étude (Chapitre 2, Article #2), n'exprimaient pas la protéine Atg5, empêchant ainsi la formation de LC3-II, essentielle dans la maturation du PAS en

autophagosome (Annexe, Figure 11). Cette observation concorde avec la littérature qui indique que les DU145 emploient l'autophagie non-canonique pour survivre aux stress qui induisent l'autophagie (276). Nous avons aussi remarqué que cette lignée cellulaire est la plus résistante à ce PARPi comparativement aux LNCaP, C4-2B et PC-3 ce qui suggère qu'il est possible que l'autophagie non-canonique joue un rôle dans la résistance innée des DU145. Cependant, nous ne pensons pas que SQSTM1/p62 soit importante pour cette dernière. En effet, nous avons observé une expression plus forte de la protéine dans les DU145, similaire à nos lignées KO dépourvues d'autophagie (Annexe, Figure 11). Il serait donc intéressant de cibler SQSTM1/p62 pour déterminer l'impact de sa diminution sur la résistance mais aussi de réintroduire Atg5 pour possiblement restaurer l'autophagie canonique. À l'heure actuelle, aucune étude n'a été réalisée démontrant le possible rôle protecteur de l'autophagie non-canonique contre des agents thérapeutiques.

Finalement, d'un point de vue plus clinique, mesurer le niveau basal d'autophagie, ou l'expression nucléaire de SQSTM1/p62, dans les tissus de patients pourraient donner une indication sur leur réponse à l'olaparib (277). L'utilisation de systèmes microfluidiques développés par le laboratoire, permettant de déterminer l'efficacité d'un traitement thérapeutique sur des morceaux de tumeur micro-disséquée, serait aussi un outil intéressant pour la continuité de l'étude (278, 279). La détermination du flux autophagique dans les tissus cancéreux doit cependant être encore améliorée et mieux définie. En effet, sachant que l'autophagie est un mécanisme dynamique avec des modifications post-traductionnelles, en particulier sur la protéine LC3, il est difficile de bien l'établir ce flux autophagique. Des études suggèrent l'utilisation d'un ensemble de marqueurs autophagiques pour avoir une idée plus représentative du mécanisme (277, 280). Ainsi, une optimisation devra être réalisée pour permettre une meilleure interprétation de ces résultats.

2. Les mécanismes de résistance acquise à l'olaparib dans le cancer de la prostate

Les mécanismes de résistance acquise pour les PARPi sont de mieux en mieux compris avec l'abondance d'études disponibles dans la littérature pour les cancers du sein et de l'ovaire mais encore trop peu étudiés dans le cancer de la prostate (110-113, 118). Pour pallier ce problème nous avons développé des lignées cellulaires du CP résistantes à l'olaparib (OR) dérivées des lignées parentales (WT) en les cultivant pendant plusieurs mois avec l'inhibiteur (281). Cette méthode est couramment utilisée dans la littérature pour découvrir de nouveaux gènes jouant un rôle dans la résistance acquise aux agents thérapeutiques (282-284). Dans l'optique de découvrir des acteurs communs de résistances à plusieurs lignées cellulaires, un microarray a été réalisé sur trois lignées de CP (LNCaP, C4-2B et DU145) ayant des mutations au niveau de BRCA1/2. Nous avons appliqué des seuils de significativité ($p=0.05$) et de variation d'expression (seuil égal/inférieur à -1.5 ou égal/supérieur à +1.5) couramment utilisés dans la littérature, afin d'obtenir une liste de gènes positivement et négativement affectés par la transformation OR. Parmi les gènes ayant une augmentation d'expression, plusieurs étaient importants dans les mécanismes de réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire mais aussi dans l'autophagie (Figure 9). Pour ceux dont l'expression diminuait, la majorité codait pour des acteurs pro-apoptotiques ou pour des inhibiteurs de prolifération cellulaire.

Il est bien connu désormais que les cellules cancéreuses résistantes aux PARPi restaurent la HR pour diminuer leur efficacité. Il n'est donc pas étonnant de retrouver des gènes des voies moléculaires liées à ces mécanismes, en particulier ceux de la réparation double brin de l'ADN. Nous avons obtenu au total quatre gènes significativement augmentés par la transformation OR inclut dans la voie moléculaire DNA_REPAIR : *sous-unité 3 du complexe BRCA1/2* (BRCC3), *WRN RecQ Like Helicase* (WRN), *l'ubiquitine spécifique peptidase 45* (USP45) et *xeroderma pigmentosum, complementation group A* (XPA). Alors que BRCC3 et WRN jouent principalement dans la réparation double brin de l'ADN, XPA et la déubiquitylase USP45, ciblant *la protéine de réparation de l'excision d'ADN* (ERCC1), jouent dans le NER (285-288). Des études réalisées ces dernières années ont mis en avant l'existence d'une corrélation entre l'augmentation

d'expression de ces acteurs et l'apparition de résistances aux agents thérapeutiques induisant des cassures de l'ADN. Effectivement, il a été démontré qu'une augmentation de l'expression de BRCC3 menait une stabilisation du complexe BRCA1/2 aux sites de cassures double brin augmentant ainsi l'efficacité de réparation de celles-ci à la suite de radiothérapie (289, 290). Les lignées cellulaires utilisées pour notre deuxième étude, les LNCaP, les C4-2B et les DU145, ont toutes les trois une mutation au niveau de BRCA2. Même en présence de cette mutation, les LNCaP et C4-2B sont capables de réparer les cassures induites par l'irradiation en utilisant le HR (Chapitre 2, Article #1). Cette capacité de réparation n'a pas été mesurée chez les DU145. Selon nos données, l'augmentation significative de l'expression de BRCC3 est accompagnée d'une augmentation non significative de celle de BRCA1 (en moyenne de 3 fois) et de BRCA2 (en moyenne de 2 fois) dans nos trois lignées OR. Ceci peut suggérer l'induction de nouvelles mutations sur ces gènes permettant une augmentation de leur expression et donc une efficacité plus importante de la HR (111, 291). Alors que le rôle de la HR dans la résistance acquise aux PARPi est bien établi, celui du NER l'est moins. Des études ont mis en avant qu'une augmentation de l'expression de XPA et d'ERCC1 conduirait à une efficacité de réparation du NER plus importante contre les cassures induites par le cisplatine (292-295). D'autres équipes ont découvert qu'une diminution d'expression d'ERCC1 menait à une diminution du NER favorisant un phénotype de sensibilité aux inhibiteurs de PARP dans le cancer du poumon (296, 297). De plus, il a été démontré que les cellules cancéreuses du poumon ayant une forte expression d'ERCC1 étaient résistantes à l'olaparib comparativement à celles ayant une expression plus faible (298). L'ensemble de ces études semblent donc mettre en avant l'importance du NER dans la résistance aux inhibiteurs de PARP. Il est donc possible que les cellules cancéreuses soient en mesure de réguler ce type de mécanisme, comme elles le font pour le HR, pour diminuer l'efficacité de ces inhibiteurs. Ainsi, l'augmentation d'USP45 que nous observons pourrait mener à une déubiquitination d'ERCC1 permettant ainsi au complexe qu'il forme avec XPF d'accéder plus facilement aux sites de cassures et donc de favoriser la réparation de celles-ci (288). La validation de l'augmentation de l'activité de ces mécanismes de réparation de l'ADN, HR et NER, pourrait ainsi être effectuée dans les nouvelles lignées devenues résistantes à l'olaparib.

La majorité des gènes avec une augmentation d'expression obtenue jouaient un rôle dans la régulation du cycle cellulaire. Parmi eux, *Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2* (ROCK2), régulant la transition de la phase G1/S, est connu pour son rôle dans l'apparition de résistance à la chimio- et radiothérapie (299-301). Des études suggèrent que son rôle cytoprotecteur est en partie dû à son impact dans le HR grâce à la transcription de ZEB1 permettant la déubiquitination et la stabilisation de la *kinase checkpoint 1* (CHK1) par USP7 (302). ROCK2 est aussi importante dans la composition du *senescence-associated secretory phenotype* (SASP) des cellules sénescents. Le SASP permet, entre autres, la production des éléments pro-inflammatoires, comme les interleukines (IL-6 et IL-8) favorisant la prolifération et l'invasion cellulaire (303). Il permet aussi la régulation de l'élimination des cellules sénescents par le système immunitaire (303). L'équipe de Dr. Ark a mis en avant qu'une inhibition de ROCK2 induit une diminution du SASP, empêchant ainsi la prolifération et l'invasion cellulaire (304, 305). Sachant que les cellules cancéreuses peuvent entrer dans un état similaire à la sénescence (*senescence-like*) pour être résistantes à l'olaparib, cibler l'activité de ROCK2 avec un inhibiteur comme l'hydroxyfasudil pourrait permettre de rétablir leur sensibilité (306-308). Une étude parue en 2018 a découvert que cet inhibiteur de ROCK2 pouvait réduire de 20% à 45% l'activité de PARP1 et PARP2 respectivement (309). L'utilisation d'inhibiteur de ROCK2 peut être considérée comme une thérapie sénomorphique en agissant sur la composition du SASP tout en évitant l'induction d'une mort cellulaire par la thérapie elle-même. Cette nouvelle thérapie est un concept nouveau en cancérologie et est encore peu retrouvée dans la littérature et mal comprise comparativement à la thérapie sénolytique, qui elle agit sur l'induction de la voie apoptotique pour induire la mort des cellules sénescents (310). Même si nous avons observé aucune différence visuelle de la morphologie cellulaire, et aucune augmentation significative de l'expression de certains composés du SASP, il serait important de déterminer si nos lignées cellulaires OR ont des caractéristiques de la sénescence. En effet, plusieurs études suggèrent que les PARPi induisent la sénescence dans le cancer de l'ovaire et du sein (306, 311). Des mesures de l'activité SA-B-Gal, de l'expression d'inhibiteurs de cycline (p21 ou p16) ou encore de composés du SASP pourraient être effectuées.

Nous avons mis en avant dans notre premier article (Chapitre 2, Article #1), que l'autophagie jouait un rôle important dans la résistance innée à l'olaparib dans nos lignées du CP. Nous avons remarqué dans notre analyse de microarray une augmentation d'expression du gène *ATG2B* codant pour la protéine portant le même nom et essentielle dans la formation de l'autophagosome (312). En plus des études démontrant l'efficacité d'une inhibition de l'autophagie pour augmenter la sensibilité aux inhibiteurs de PARP, d'autres ont mis en avant l'importance de l'augmentation de l'expression d'*ATG2B* dans la mise en place de résistance à l'imatinib et au cisplatine (313-315). Cette variation d'*ATG2B* semblait être principalement contrôlée via l'expression de certains microARN (miR) comme miR-130a, miR-375 ou encore miR-143. Ces miRs sont des petits ARN non codant reconnaissant une séquence d'environ 17 à 27 nucléotides d'un ARN cible pouvant soit induire la dégradation de l'ARNm, soit inhiber sa traduction en protéine. Il est intéressant de noter qu'en plus de cibler *ATG2B*, le miR-130a régule aussi le niveau de traduction de plusieurs gènes présents dans la liste de ceux dont nous avons observé une augmentation significative de l'expression. Citons par exemple *ACBD3*, *BBX* ou encore *WRN* (316, 317). Il est donc possible que l'expression de certains miRs soit diminuée lors de l'acquisition de résistance dans notre modèle. Il est intéressant de noter qu'il a été démontré que l'autophagie, grâce à *calcium binding and coiled-coil domain 2* (*NDP52/CALCOCO2*), peut aussi réguler la production de miR en dégradant l'enzyme DICER et la protéine *argonaute-2* (*AGO2*), essentielles dans la maturation des miRs (318). Il est donc possible que la diminution des miRs soit due à une augmentation du processus autophagique. L'utilisation de la combinaison d'inhibiteurs de PARP et de thérapie basée sur les miRs connaît depuis quelques années un intérêt grandissant. En effet, plusieurs études ont suggéré l'effet bénéfique de cette nouvelle séquence de traitement pour pallier les problèmes de résistance aux PARPi (319-321). Ainsi, une mesure d'expression de certains miRs ainsi qu'une réexpression, ou inhibition de ceux-ci pourraient être réalisées (322) (Figure 9). D'autres gènes obtenus dans notre première analyse globale d'enrichissement GSEA comme *KIF5B* ou la *protéine 3 de type facteur de ribosylation ADP* (*ARL3*), inclus dans la voie moléculaire de transport des protéines le long des microtubules (*PROTEIN_TRANSPORT_ALONG_MICROTUBULES*), appuient aussi le possible rôle de l'autophagie dans cette résistance acquise. En effet, comme décrit précédemment (Chapitre 1, Partie 3.1.1.1),

KIF5B joue un rôle important dans la formation des proto-lysosomes qui suit le processus autophagique et des études ont démontré qu'une déplétion d'ARL3 menait à une inhibition de l'autophagie (323-325). Même si ces gènes sortent non significatifs avec les seuils choisis lors de notre seconde analyse, ils sont 2 à 3 fois plus exprimés dans les lignées OR que dans les lignées parentales. Il serait donc intéressant de mesurer les niveaux d'autophagie dans les lignées OR ainsi que l'effet de son inhibition sur la résistance. Des résultats obtenus lors de notre première étude nous ont indiqué que l'olaparib induisait l'autophagie dans les LNCaP et les C4-2B (Annexe, Figure 12). Il ne serait donc pas étonnant de voir un niveau basal plus élevé d'autophagie dans ces lignées cellulaires OR. Une mesure du nombre de lysosomes pourrait aussi être réalisée afin de déterminer si ces derniers peuvent aussi jouer un rôle dans la résistance acquise.

Nos analyses mettent aussi en avant que plusieurs gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques et régulant l'arrêt de la prolifération cellulaire ont une diminution significative de leur expression dans les lignées OR. On y retrouve par exemple *GRAM domain containing 4* (GRAMD4), la *sirtuine 3* (SIRT3), le *gène de la cassette 4 se liant à l'ATP* (ABCB4) et l'*acétylcholinestérase* (ACHE). Plusieurs équipes de recherche ont mis en avant qu'une diminution de l'expression de ces protéines favorise le développement de résistance à différents agents thérapeutiques, comme le cisplatine, en diminuant l'induction d'apoptose (326-328). Nous avons aussi observé une diminution d'expression mais non significative de d'autres acteurs pro-apoptotiques de la famille *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) comme l'*agoniste associé à la protéine de mort cellulaire BCL2* (Bad) et la *protéine Bcl-2–associated X* (Bax), mais aussi une augmentation de ceux qui sont anti-apoptiques comme la *protéine de différenciation des cellules de leucémie myéloïde* (MCL-1) et *BCL-2*. Par ailleurs, il a été déterminé dans la littérature que les cellules sénescents étaient résistantes à l'apoptose en affectant l'expression d'acteurs anti- et pro-apoptotiques (329). Plusieurs études ont déjà démontré l'efficacité de certains agents sénolytiques induisant l'apoptose sur des cellules cancéreuses résistantes aux inhibiteurs de PARP (306, 330-332). C'est le cas par exemple l'ABT-263, ciblant Bcl-2 et Bcl-XL, dans le cancer de l'ovaire (306). Ces données préliminaires renforcent l'idée de mieux caractériser la sénescence mais aussi l'apoptose dans nos lignées devenues résistantes à l'olaparib. Une combinaison avec

des agents sénolytiques pourrait aussi permettre de cibler spécifiquement cette résistance acquise (Figure 9).

Les expériences réalisées nous donnent un aperçu des voies moléculaires les plus affectées par la transformation OR et pouvant ainsi jouer dans la résistance acquise à l'olaparib. Cependant, l'ensemble des cibles sélectionnées devront être validées et les voies moléculaires qui leur sont liées évaluées. Nous n'excluons pas le fait qu'une combinaison de l'altération de plusieurs de ces voies moléculaires puisse réguler cette résistance acquise. De plus, il serait aussi important de déterminer si ces nouvelles lignées résistantes à l'olaparib sont aussi résistantes aux autres inhibiteurs de PARP (talazoparib ou niraparib). Ceci permettrait éventuellement de découvrir un mécanisme de résistance acquise commun des PARPi. Ces données pourraient être aussi complétées par le développement de lignées résistantes à ces autres inhibiteurs, dans la suite de cette seconde étude.

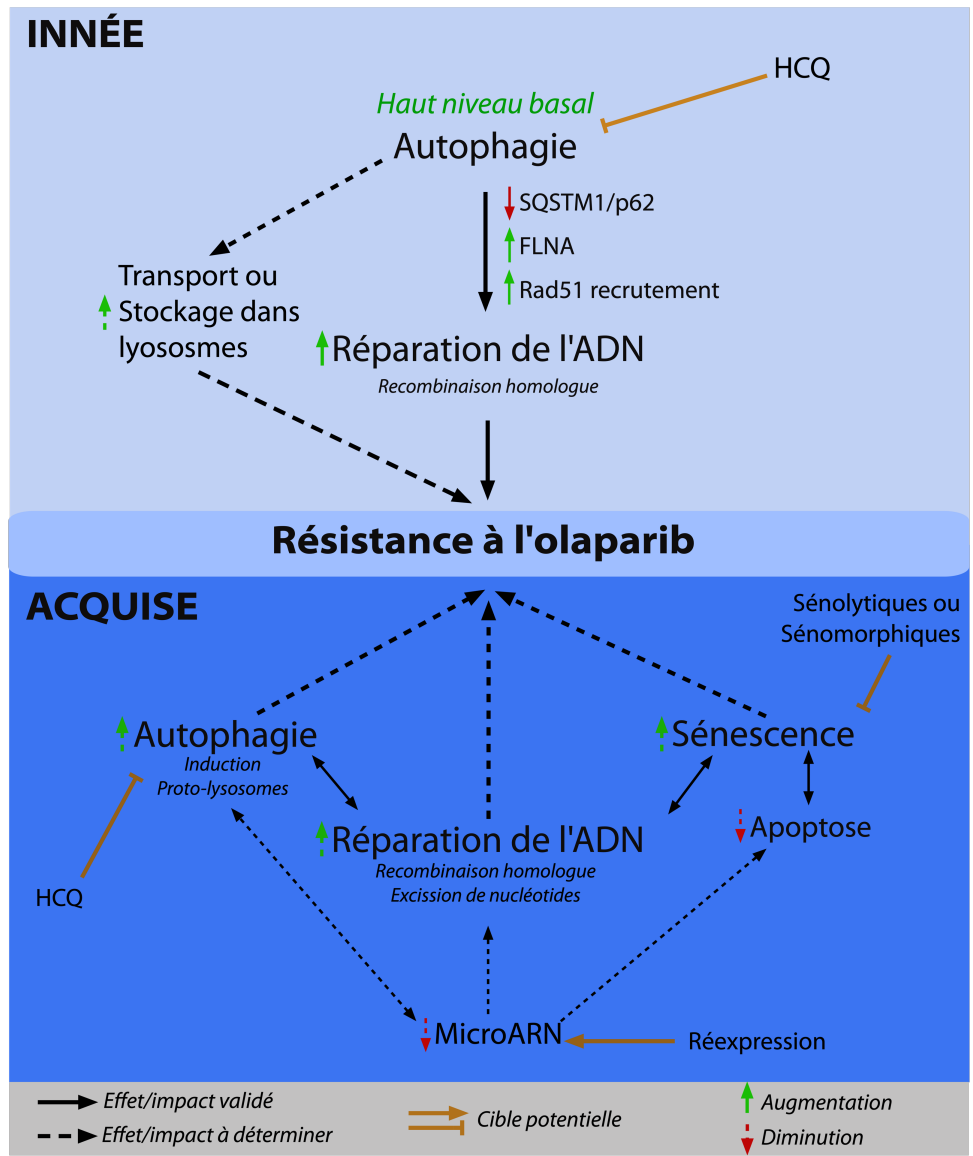


Figure 9. – Mécanismes de résistance innée et acquise à l’olaparib dans le CP.

L’autophagie est un régulateur majeur dans la résistance innée en affectant la recombinaison homologue afin de réparer plus efficacement les cassures induites par l’olaparib. Il est possible qu’elle puisse aussi réguler le transport et le stockage de ce PARPi dans les lysosomes. Trois voies moléculaires (l’autophagie, la réparation de l’ADN et la sénescence), interagissant entre elles, pourraient être à l’origine de la résistance acquise à l’olaparib dans le cancer de la prostate. L’utilisation de HCQ, d’agents sénolytiques ou sénomorphiques et la réexpression de certains miRs pourraient limiter cette résistance.

Chapitre 4 – CONCLUSION

Ce projet de thèse s'est intéressé à deux facettes de la résistance aux inhibiteurs de PARP dans le cancer de la prostate : la résistance innée et la résistance acquise. Ces deux types de résistances restent un problème majeur dans le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses et doivent être compris pour les anticiper et les contrer. Les inhibiteurs de PARP étant présentement en essais cliniques pour le cancer de la prostate, il est essentiel de comprendre comment les cellules cancéreuses peuvent devenir résistantes pour limiter l'effets de ces inhibiteurs. Les informations disponibles dans la littérature pour les autres cancers où ces PARPi sont utilisés, nous donnent une idée des mécanismes de résistance à étudier dans le cancer de la prostate.

Nous avons découvert dans notre première étude que l'autophagie régula la résistance à l'olaparib dans trois lignées cellulaires du cancer de la prostate. Contrairement aux travaux parus dans la littérature, nous mettons en avant l'importance du niveau basal d'autophagie et non son activation à la suite du traitement, dans la réponse innée à l'olaparib. En effet, un haut niveau d'activation autophagique avant le traitement à l'olaparib rend moins sensible les lignées à cet inhibiteur de PARP. Nous avons aussi démontré que cet effet cytoprotecteur de l'autophagie est régulé par l'expression nucléaire de SQSTM1/p62 qui affecte, dans la cellule, l'efficacité des réparations des cassures double brin de l'ADN induites par l'olaparib. Une diminution de l'expression de cette protéine dans les lignées WT et dépourvues d'autophagie, avant le traitement à l'olaparib, induit un effet protecteur aux cellules. C'est la première fois, à notre connaissance, que ce rôle de SQSTM1/p62 dans la résistance à cet inhibiteur de PARP a été illustré. Nous pensons que les mesures des niveaux d'autophagie et de SQSTM1/p62 pourraient permettre d'avoir une meilleure idée de la réponse des patients à l'olaparib. De plus, cibler ces deux facteurs pourrait permettre une augmentation de l'efficacité de ce nouveau traitement et ainsi augmenter l'espérance de vie des patients.

Dans notre deuxième étude, nous avons développé pour la première fois des lignées cellulaires de cancer de la prostate résistantes à l'olaparib dérivées de lignées parentales disponibles commercialement afin d'explorer les voies moléculaires induisant la résistance

acquise à cet inhibiteur dans ce cancer. Une analyse du profil moléculaire de ces nouvelles lignées nous a permis d'obtenir des pistes intéressantes à étudier plus en détails. Parmi elles, les mécanismes de réparation de l'ADN, la sénescence, l'autophagie mais aussi la régulation des microARN sont les plus importantes. Une meilleure compréhension du rôle de ces différentes voies dans la résistance acquise pourrait permettre l'élaboration de nouvelles thérapies pour contrer l'apparition de résistance au cours du temps.

En conclusion, cette thèse donne de nouveaux outils dans la compréhension de la résistance innée mais aussi dans la mise en place de la résistance acquise à l'olaparib dans le cancer de la prostate.

Références bibliographiques

1. Saad F, McCormack M. Le cancer de la prostate. 4th ed. Montréal: Annika Parance Publishing; 2015.
2. Leslie SW, Soon-Sutton TL, Sajjad H, Siref LE. Prostate Cancer. StatPearls. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2021.
3. Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol.* 2003;21(2):383-91.
4. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1):7-33.
5. Brenner DR, Weir HK, Demers AA, Ellison LF, Louzado C, Shaw A, et al. Projected estimates of cancer in Canada in 2020. *CMAJ.* 2020;192(9):E199-E205.
6. cancer.ca [Internet]. Statistiques sur le cancer de la prostate 2020 Société canadienne du cancer [updated 2022 May; cited 2021 July 10]. Available from: <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/prostate/statistics/?region=on>.
7. Stangelberger A, Waldert M, Djavan B. Prostate cancer in elderly men. *Rev Urol.* 2008;10(2):111-9.
8. Song Y, Chavarro JE, Cao Y, Qiu W, Mucci L, Sesso HD, et al. Whole milk intake is associated with prostate cancer-specific mortality among U.S. male physicians. *J Nutr.* 2013;143(2):189-96.
9. Pettersson A, Kasperzyk JL, Kenfield SA, Richman EL, Chan JM, Willett WC, et al. Milk and dairy consumption among men with prostate cancer and risk of metastases and prostate cancer death. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21(3):428-36.
10. Lin PH, Aronson W, Freedland SJ. Nutrition, dietary interventions and prostate cancer: the latest evidence. *BMC Med.* 2015;13:3.
11. Lavalette C, Tretarre B, Rebillard X, Lamy PJ, Cenee S, Menegaux F. Abdominal obesity and prostate cancer risk: epidemiological evidence from the EPICAP study. *Oncotarget.* 2018;9(77):34485-94.
12. Wilson KM, Giovannucci EL, Mucci LA. Lifestyle and dietary factors in the prevention of lethal prostate cancer. *Asian J Androl.* 2012;14(3):365-74.

13. Schenk JM, Till CA, Tangen CM, Goodman PJ, Song X, Torkko KC, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk of prostate cancer: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(8):1484-93.
14. Pienta KJ, Esper PS. Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med.* 1993;118(10):793-803.
15. Kicinski M, Vangronsveld J, Nawrot TS. An epidemiological reappraisal of the familial aggregation of prostate cancer: a meta-analysis. *PLoS One.* 2011;6(10):e27130.
16. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(8):3367-71.
17. Gronberg H, Damber L, Damber JE. Studies of genetic factors in prostate cancer in a twin population. *J Urol.* 1994;152(5 Pt 1):1484-7; discussion 7-9.
18. Castro E, Eeles R. The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. *Asian J Androl.* 2012;14(3):409-14.
19. Dong JT. Prevalent mutations in prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2006;97(3):433-47.
20. Rendon RA, Mason RJ, Marzouk K, Finelli A, Saad F, So A, et al. Recommendations de l'Association des urologues du Canada sur le dépistage et le diagnostic précoce du cancer de la prostate. *Can Urol Assoc J.* 2017;11(10):298-309.
21. Sivaraman A, Bhat KRS. Screening and Detection of Prostate Cancer-Review of Literature and Current Perspective. *Indian J Surg Oncol.* 2017;8(2):160-8.
22. Bailar JC, 3rd, Mellinger GT, Gleason DF. Survival rates of patients with prostatic cancer, tumor stage, and differentiation--preliminary report. *Cancer Chemother Rep.* 1966;50(3):129-36.
23. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep.* 1966;50(3):125-8.
24. Brauhut BL, Punnen S, Kryvenko ON. Updates on Grading and Staging of Prostate Cancer. *Surg Pathol Clin.* 2018;11(4):759-74.
25. cancer.ca [Internet]. Classification histologique du cancer de la prostate: Société canadienne du cancer; [updated 2021 February; cited 2021 July 15]. Available from: <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/prostate/grading/?region=on>.

26. Chen N, Zhou Q. The evolving Gleason grading system. *Chin J Cancer Res.* 2016;28(1):58-64.
27. Denoix P. [Ongoing investigation in cancer centers]. *Bull Inst Natl Hyg.* 1946;1:12-7.
28. urologyhealth.org [Internet]. What is Advanced Prostate Cancer? Urology Care Foundation [updated 2021 September; cited 2021 August 20]. Available from: https://www.urologyhealth.org/urology-a-z/a/_advanced-prostate-cancer.
29. Fergusson JD. Irradiation therapy for prostatic cancer. *Br J Urol.* 1954;26(4):347-9.
30. Rusche CF, Jaffe HL. Treatment of bladder and prostatic cancer by combined interstitial isotope radiation and the cobalt bomb. *J Urol.* 1958;79(3):474-89.
31. Dehm SM, Tindall DJ. Regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2005;5(1):63-74.
32. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev.* 2004;25(2):276-308.
33. Jin HJ, Kim J, Yu J. Androgen receptor genomic regulation. *Transl Androl Urol.* 2013;2(3):157-77.
34. Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36(1):3-23.
35. Jariwala U, Prescott J, Jia L, Barski A, Pregizer S, Cogan JP, et al. Identification of novel androgen receptor target genes in prostate cancer. *Mol Cancer.* 2007;6:39.
36. Pace JN, Miller JL, Rose LI. GnRH agonists: gonadorelin, leuprolide and nafarelin. *Am Fam Physician.* 1991;44(5):1777-82.
37. Wilson AC, Meethal SV, Bowen RL, Atwood CS. Leuprolide acetate: a drug of diverse clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs.* 2007;16(11):1851-63.
38. Schellhammer PF, Davis JW. An evaluation of bicalutamide in the treatment of prostate cancer. *Clin Prostate Cancer.* 2004;2(4):213-9.
39. Francini E, Sweeney CJ. Docetaxel Activity in the Era of Life-prolonging Hormonal Therapies for Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2016;70(3):410-2.

40. Fernandez O, Afonso J, Vazquez S, Campos B, Lazaro M, Leon L, et al. Metastatic castration-resistant prostate cancer: changing landscape with cabazitaxel. *Anticancer Drugs*. 2014;25(3):237-43.
41. Nader R, El Amm J, Aragon-Ching JB. Role of chemotherapy in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2018;20(3):221-9.
42. James ND, Sydes MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, Spears MR, et al. Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10024):1163-77.
43. Tucci M, Bertaglia V, Vignani F, Buttigliero C, Fiori C, Porpiglia F, et al. Addition of Docetaxel to Androgen Deprivation Therapy for Patients with Hormone-sensitive Metastatic Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol*. 2016;69(4):563-73.
44. Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med*. 2004;10(1):33-9.
45. Edwards J, Krishna NS, Grigor KM, Bartlett JM. Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer. *Br J Cancer*. 2003;89(3):552-6.
46. Ford OH, 3rd, Gregory CW, Kim D, Smitherman AB, Mohler JL. Androgen receptor gene amplification and protein expression in recurrent prostate cancer. *J Urol*. 2003;170(5):1817-21.
47. Sun S, Sprenger CC, Vessella RL, Haugk K, Soriano K, Mostaghel EA, et al. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J Clin Invest*. 2010;120(8):2715-30.
48. Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer research*. 2008;68(13):5469-77.
49. Ueda T, Mawji NR, Bruchofsky N, Sadar MD. Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2002;277(41):38087-94.

50. Heidenreich A, Pfister D, Merseburger A, Bartsch G, German Working Group on Castration-Resistant Prostate C. Castration-resistant prostate cancer: where we stand in 2013 and what urologists should know. *Eur Urol.* 2013;64(2):260-5.
51. Dellis AE, Papatsoris AG. Perspectives on the current and emerging chemical androgen receptor antagonists for the treatment of prostate cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2019;20(2):163-72.
52. Clegg NJ, Wongvipat J, Joseph JD, Tran C, Ouk S, Dilhas A, et al. ARN-509: a novel antiandrogen for prostate cancer treatment. *Cancer research.* 2012;72(6):1494-503.
53. Bastos DA, Antonarakis ES. Galeterone for the treatment of advanced prostate cancer: the evidence to date. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:2289-97.
54. Van Hook K, Huang T, Alumkal JJ. Orteronel for the treatment of prostate cancer. *Future Oncol.* 2014;10(5):803-11.
55. Postel-Vinay S, Vanhecke E, Olausson KA, Lord CJ, Ashworth A, Soria JC. The potential of exploiting DNA-repair defects for optimizing lung cancer treatment. *Nature reviews Clinical oncology.* 2012;9(3):144-55.
56. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature.* 2012;481(7381):287-94.
57. Houtgraaf JH, Versmissen J, van der Giessen WJ. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med.* 2006;7(3):165-72.
58. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 1993;362(6422):709-15.
59. Lindahl T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(9):3649-53.
60. Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol.* 1998;18(6):3563-71.
61. El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H, Caldecott KW. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(19):5526-33.

62. Otterlei M, Warbrick E, Nagelhus TA, Haug T, Slupphaug G, Akbari M, et al. Post-replicative base excision repair in replication foci. *EMBO J.* 1999;18(13):3834-44.
63. Krokan HE, Bjoras M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a012583.
64. Witkin EM, Sicurella NA. Pure Clones of Lactose-Negative Mutants Obtained in *Escherichia Coli* after Treatment with 5-Bromouracil. *J Mol Biol.* 1964;8:610-3.
65. Holliday R. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet Res.* 2007;89(5-6):285-307.
66. Fishel R. Mismatch repair. *J Biol Chem.* 2015;290(44):26395-403.
67. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001;411(6835):366-74.
68. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(2):110-20.
69. Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer research.* 1997;57(16):3347-50.
70. Howard JH, Frolov A, Tzeng CW, Stewart A, Midzak A, Majmundar A, et al. Epigenetic downregulation of the DNA repair gene MED1/MBD4 in colorectal and ovarian cancer. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(1):94-100.
71. Lahtz C, Pfeifer GP. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *J Mol Cell Biol.* 2011;3(1):51-8.
72. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA.* 2017;317(23):2402-16.
73. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol.* 2007;25(11):1329-33.
74. Martin LM, Marples B, Coffey M, Lawler M, Lynch TH, Hollywood D, et al. DNA mismatch repair and the DNA damage response to ionizing radiation: making sense of apparently conflicting data. *Cancer Treat Rev.* 2010;36(7):518-27.
75. Guan H, Ji M, Hou P, Liu Z, Wang C, Shan Z, et al. Hypermethylation of the DNA mismatch repair gene hMLH1 and its association with lymph node metastasis and T1799A BRAF mutation in patients with papillary thyroid cancer. *Cancer.* 2008;113(2):247-55.

76. Lozano R, Castro E, Aragon IM, Cendon Y, Cattrini C, Lopez-Casas PP, et al. Genetic aberrations in DNA repair pathways: a cornerstone of precision oncology in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2021;124(3):552-63.
77. Abida W, Cheng ML, Armenia J, Middha S, Autio KA, Vargas HA, et al. Analysis of the Prevalence of Microsatellite Instability in Prostate Cancer and Response to Immune Checkpoint Blockade. *JAMA Oncol*. 2019;5(4):471-8.
78. Clarke N, Wiechno P, Alekseev B, Sala N, Jones R, Kocak I, et al. Olaparib combined with abiraterone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(7):975-86.
79. de Bono J, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, et al. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2020;382(22):2091-102.
80. Mateo J, Porta N, Bianchini D, McGovern U, Elliott T, Jones R, et al. Olaparib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer with DNA repair gene aberrations (TOPARP-B): a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(1):162-74.
81. Durkacz BW, Omidiji O, Gray DA, Shall S. (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature*. 1980;283(5747):593-6.
82. Curtin NJ, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(10):711-36.
83. Beck C, Robert I, Reina-San-Martin B, Schreiber V, Dantzer F. Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3. *Exp Cell Res*. 2014;329(1):18-25.
84. Karlberg T, Langelier MF, Pascal JM, Schuler H. Structural biology of the writers, readers, and erasers in mono- and poly(ADP-ribose) mediated signaling. *Mol Aspects Med*. 2013;34(6):1088-108.
85. Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem*. 2000;275(52):40974-80.
86. Bryant HE, Petermann E, Schultz N, Jemth AS, Loseva O, Issaeva N, et al. PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *EMBO J*. 2009;28(17):2601-15.

87. Haince JF, Kozlov S, Dawson VL, Dawson TM, Hendzel MJ, Lavin MF, et al. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem.* 2007;282(22):16441-53.
88. Schiewer MJ, Knudsen KE. Transcriptional roles of PARP1 in cancer. *Mol Cancer Res.* 2014;12(8):1069-80.
89. Elser M, Borsig L, Hassa PO, Erener S, Messner S, Valovka T, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 promotes tumor cell survival by coactivating hypoxia-inducible factor-1-dependent gene expression. *Mol Cancer Res.* 2008;6(2):282-90.
90. Martin-Oliva D, Aguilar-Quesada R, O'Valle F, Munoz-Gamez JA, Martinez-Romero R, Garcia Del Moral R, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. *Cancer research.* 2006;66(11):5744-56.
91. Ossovskaya V, Koo IC, Kaldjian EP, Alvares C, Sherman BM. Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types. *Genes Cancer.* 2010;1(8):812-21.
92. Godoy H, Mhaweche-Fauceglia P, Beck A, Miller A, Lele S, Odunsi K. Expression of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase and p53 in epithelial ovarian cancer and their role in prognosis and disease outcome. *Int J Gynecol Pathol.* 2011;30(2):139-44.
93. Banasik M, Komura H, Shimoyama M, Ueda K. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem.* 1992;267(3):1569-75.
94. Arundel-Suto CM, Scavone SV, Turner WR, Suto MJ, Sebolt-Leopold JS. Effect of PD 128763, a new potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, on X-ray-induced cellular recovery processes in Chinese hamster V79 cells. *Radiat Res.* 1991;126(3):367-71.
95. Gavande NS, VanderVere-Carozza PS, Hinshaw HD, Jalal SI, Sears CR, Pawelczak KS, et al. DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? *Pharmacol Ther.* 2016;160:65-83.
96. Adashek JJ, Jain RK, Zhang J. Clinical Development of PARP Inhibitors in Treating Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cells.* 2019;8(8).

97. Murai J, Huang SY, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer research*. 2012;72(21):5588-99.
98. Murai J, Huang SY, Renaud A, Zhang Y, Ji J, Takeda S, et al. Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(2):433-43.
99. Satoh MS, Lindahl T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature*. 1992;356(6367):356-8.
100. Curtin NJ, Wang LZ, Yiakouvakaki A, Kyle S, Arris CA, Canan-Koch S, et al. Novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, AG14361, restores sensitivity to temozolomide in mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res*. 2004;10(3):881-9.
101. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*. 2005;434(7035):913-7.
102. Jagtap PG, Baloglu E, Southan GJ, Mabley JG, Li H, Zhou J, et al. Discovery of potent poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors from the modification of indeno[1,2-c]isoquinolinone. *J Med Chem*. 2005;48(16):5100-3.
103. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Bialkowska A, Swift S, et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer research*. 2006;66(16):8109-15.
104. Huhn D, Bolck HA, Sartori AA. Targeting DNA double-strand break signalling and repair: recent advances in cancer therapy. *Swiss Med Wkly*. 2013;143:w13837.
105. Saad F, Shore N, Zhang T, Sharma S, Cho HK, Jacobs IA. Emerging therapeutic targets for patients with advanced prostate cancer. *Cancer Treat Rev*. 2019;76:1-9.
106. Mateo J, Carreira S, Sandhu S, Miranda S, Mossop H, Perez-Lopez R, et al. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(18):1697-708.
107. Chi KN, Rathkopf DE, Smith MR, Efsthathiou E, Attard G, Olmos D, et al. Phase 3 MAGNITUDE study: First results of niraparib (NIRA) with abiraterone acetate and prednisone (AAP) as first-line therapy in patients (pts) with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) with and without homologous recombination repair (HRR) gene alterations. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40(6_suppl):12-.

108. Han Y, Yu X, Li S, Tian Y, Liu C. New Perspectives for Resistance to PARP Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol.* 2020;10:578095.
109. Kim DS, Camacho CV, Kraus WL. Alternate therapeutic pathways for PARP inhibitors and potential mechanisms of resistance. *Exp Mol Med.* 2021;53(1):42-51.
110. Genta S, Martorana F, Stathis A, Colombo I. Targeting the DNA damage response: PARP inhibitors and new perspectives in the landscape of cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021;168:103539.
111. Norquist B, Wurz KA, Pennil CC, Garcia R, Gross J, Sakai W, et al. Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas. *J Clin Oncol.* 2011;29(22):3008-15.
112. Kondrashova O, Nguyen M, Shield-Artin K, Tinker AV, Teng NNH, Harrell MI, et al. Secondary Somatic Mutations Restoring RAD51C and RAD51D Associated with Acquired Resistance to the PARP Inhibitor Rucaparib in High-Grade Ovarian Carcinoma. *Cancer Discov.* 2017;7(9):984-98.
113. Liu Y, Burness ML, Martin-Trevino R, Guy J, Bai S, Harouaka R, et al. RAD51 Mediates Resistance of Cancer Stem Cells to PARP Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(2):514-22.
114. He YJ, Meghani K, Caron MC, Yang C, Ronato DA, Bian J, et al. DYNLL1 binds to MRE11 to limit DNA end resection in BRCA1-deficient cells. *Nature.* 2018;563(7732):522-6.
115. Bunting SF, Callen E, Wong N, Chen HT, Polato F, Gunn A, et al. 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell.* 2010;141(2):243-54.
116. Rondinelli B, Gogola E, Yucel H, Duarte AA, van de Ven M, van der Sluijs R, et al. EZH2 promotes degradation of stalled replication forks by recruiting MUS81 through histone H3 trimethylation. *Nat Cell Biol.* 2017;19(11):1371-8.
117. Taglialatela A, Alvarez S, Leuzzi G, Sannino V, Ranjha L, Huang JW, et al. Restoration of Replication Fork Stability in BRCA1- and BRCA2-Deficient Cells by Inactivation of SNF2-Family Fork Remodelers. *Molecular cell.* 2017;68(2):414-30 e8.

118. Pettitt SJ, Krastev DB, Brandsma I, Drean A, Song F, Aleksandrov R, et al. Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance. *Nature communications*. 2018;9(1):1849.
119. Du Y, Yamaguchi H, Wei Y, Hsu JL, Wang HL, Hsu YH, et al. Blocking c-Met-mediated PARP1 phosphorylation enhances anti-tumor effects of PARP inhibitors. *Nat Med*. 2016;22(2):194-201.
120. Christie EL, Pattnaik S, Beach J, Copeland A, Rashoo N, Fereday S, et al. Multiple ABCB1 transcriptional fusions in drug resistant high-grade serous ovarian and breast cancer. *Nature communications*. 2019;10(1):1295.
121. Arun B, Akar U, Gutierrez-Barrera AM, Hortobagyi GN, Ozpolat B. The PARP inhibitor AZD2281 (Olaparib) induces autophagy/mitophagy in BRCA1 and BRCA2 mutant breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2015;47(1):262-8.
122. Ji Y, Wang Q, Zhao Q, Zhao S, Li L, Sun G, et al. Autophagy suppression enhances DNA damage and cell death upon treatment with PARP inhibitor Niraparib in laryngeal squamous cell carcinoma. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(23-24):9557-68.
123. Pai Bellare G, Saha B, Patro BS. Targeting autophagy reverses de novo resistance in homologous recombination repair proficient breast cancers to PARP inhibition. *Br J Cancer*. 2021;124(7):1260-74.
124. De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*. 1955;60(4):604-17.
125. Novikoff AB, Beaufay H, De Duve C. Electron microscopy of lysosomeric fractions from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol*. 1956;2(4 Suppl):179-84.
126. Clark SL, Jr. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol*. 1957;3(3):349-62.
127. de Duve C, editor. *Ciba Foundation Symposium on Lysosomes*; 1973; London: J.A. Churchill Ltd.
128. Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*. 2008;4(6):740-3.

129. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1993;333(1-2):169-74.
130. Harding TM, Morano KA, Scott SV, Klionsky DJ. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *The Journal of cell biology.* 1995;131(3):591-602.
131. Thumm M, Egner R, Koch B, Schlumpberger M, Straub M, Veenhuis M, et al. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1994;349(2):275-80.
132. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr., Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental cell.* 2003;5(4):539-45.
133. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008;451(7182):1069-75.
134. Farre JC, Subramani S. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(9):537-52.
135. Dupont N, Codogno P. Non-canonical Autophagy: Facts and Prospects. *Current Pathobiology Reports.* 2013;1(4):263-71.
136. Blommaert EF, Luiken JJ, Blommaert PJ, van Woerkom GM, Meijer AJ. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1995;270(5):2320-6.
137. Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science.* 2011;334(6056):678-83.
138. Paquette M, El-Houjeiri L, Pause A. mTOR Pathways in Cancer and Autophagy. *Cancers (Basel).* 2018;10(1).
139. Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science.* 2009;325(5939):473-7.
140. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell.* 2009;20(7):1981-91.

141. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*. 2009;20(7):1992-2003.
142. Nazio F, Strappazon F, Antonioli M, Bielli P, Cianfanelli V, Bordi M, et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat Cell Biol*. 2013;15(4):406-16.
143. Polson HE, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbe S, Clague MJ, et al. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*. 2010;6(4):506-22.
144. Dooley HC. Investigation of the Role of WIPI2 in Autophagosome Formation: Functional Characterisation of the WIPI2-Atg16L1 Interaction 2014.
145. Dooley HC, Razi M, Polson HE, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Molecular cell*. 2014;55(2):238-52.
146. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 2000;408(6811):488-92.
147. Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, et al. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *The Journal of cell biology*. 1999;147(2):435-46.
148. Itakura E, Mizushima N. p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *The Journal of cell biology*. 2011;192(1):17-27.
149. Aplin A, Jasionowski T, Tuttle DL, Lenk SE, Dunn WA, Jr. Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *J Cell Physiol*. 1992;152(3):458-66.
150. Kochl R, Hu XW, Chan EY, Tooze SA. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic*. 2006;7(2):129-45.
151. Jordens I, Fernandez-Borja M, Marsman M, Dusseljee S, Janssen L, Calafat J, et al. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Current biology : CB*. 2001;11(21):1680-5.

152. Wijdeven RH, Janssen H, Nahidiazar L, Janssen L, Jalink K, Berlin I, et al. Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway. *Nature communications*. 2016;7:11808.
153. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*. 2012;151(6):1256-69.
154. Wang Z, Miao G, Xue X, Guo X, Yuan C, Wang Z, et al. The Vici Syndrome Protein EPG5 Is a Rab7 Effector that Determines the Fusion Specificity of Autophagosomes with Late Endosomes/Lysosomes. *Molecular cell*. 2016;63(5):781-95.
155. Wang H, Sun HQ, Zhu X, Zhang L, Albanesi J, Levine B, et al. GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(22):7015-20.
156. Albanesi J, Wang H, Sun HQ, Levine B, Yin H. GABARAP-mediated targeting of PI4K2A/PI4KIIalpha to autophagosomes regulates PtdIns4P-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. 2015;11(11):2127-9.
157. Wu Y, Cheng S, Zhao H, Zou W, Yoshina S, Mitani S, et al. PI3P phosphatase activity is required for autophagosome maturation and autolysosome formation. *EMBO reports*. 2014;15(9):973-81.
158. Suriapranata I, Epple UD, Bernreuther D, Bredschneider M, Sovarasteanu K, Thumm M. The breakdown of autophagic vesicles inside the vacuole depends on Aut4p. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 22):4025-33.
159. Sagne C, Agulhon C, Ravassard P, Darmon M, Hamon M, El Mestikawy S, et al. Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(13):7206-11.
160. Rong Y, McPhee CK, Deng S, Huang L, Chen L, Liu M, et al. Spinster is required for autophagic lysosome reformation and mTOR reactivation following starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(19):7826-31.
161. Nakamura S, Yoshimori T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Sci*. 2017;130(7):1209-16.
162. Chen Y, Yu L. Development of Research into Autophagic Lysosome Reformation. *Mol Cells*. 2018;41(1):45-9.

163. Chen Y, Yu L. Recent progress in autophagic lysosome reformation. *Traffic*. 2017;18(6):358-61.
164. Du W, Su QP, Chen Y, Zhu Y, Jiang D, Rong Y, et al. Kinesin 1 Drives Autolysosome Tubulation. *Developmental cell*. 2016;37(4):326-36.
165. Rong Y, Liu M, Ma L, Du W, Zhang H, Tian Y, et al. Clathrin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulate autophagic lysosome reformation. *Nat Cell Biol*. 2012;14(9):924-34.
166. Schulze RJ, Weller SG, Schroeder B, Krueger EW, Chi S, Casey CA, et al. Lipid droplet breakdown requires dynamin 2 for vesiculation of autolysosomal tubules in hepatocytes. *The Journal of cell biology*. 2013;203(2):315-26.
167. Yano K, Hattori M, Moriyasu Y. A novel type of autophagy occurs together with vacuole genesis in miniprotoplasts prepared from tobacco culture cells. *Autophagy*. 2007;3(3):215-21.
168. Zhu JH, Horbinski C, Guo F, Watkins S, Uchiyama Y, Chu CT. Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *Am J Pathol*. 2007;170(1):75-86.
169. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ*. 2008;15(8):1318-29.
170. Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*. 2009;461(7264):654-8.
171. Kung CP, Budina A, Balaburski G, Bergenstock MK, Murphy M. Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2011;21(1):71-100.
172. Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer*. 2020;19(1):12.
173. Asim M, Tarish F, Zecchini HI, Sanjiv K, Gelali E, Massie CE, et al. Synthetic lethality between androgen receptor signalling and the PARP pathway in prostate cancer. *Nature communications*. 2017;8(1):374.
174. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev*. 2007;21(11):1367-81.

175. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*. 2009;137(6):1062-75.
176. Bae D, Lu S, Taglienti CA, Mercurio AM. Metabolic stress induces the lysosomal degradation of neuropilin-1 but not neuropilin-2. *J Biol Chem*. 2008;283(42):28074-80.
177. Kisen GO, Tessitore L, Costelli P, Gordon PB, Schwarze PE, Baccino FM, et al. Reduced autophagic activity in primary rat hepatocellular carcinoma and ascites hepatoma cells. *Carcinogenesis*. 1993;14(12):2501-5.
178. Blessing AM, Rajapakshe K, Reddy Bollu L, Shi Y, White MA, Pham AH, et al. Transcriptional regulation of core autophagy and lysosomal genes by the androgen receptor promotes prostate cancer progression. *Autophagy*. 2017;13(3):506-21.
179. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1809-20.
180. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Kim SS, et al. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol*. 2009;217(5):702-6.
181. Grassi G, Di Caprio G, Santangelo L, Fimia GM, Cozzolino AM, Komatsu M, et al. Autophagy regulates hepatocyte identity and epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions promoting Snail degradation. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1880.
182. Qin W, Li C, Zheng W, Guo Q, Zhang Y, Kang M, et al. Inhibition of autophagy promotes metastasis and glycolysis by inducing ROS in gastric cancer cells. *Oncotarget*. 2015;6(37):39839-54.
183. Joffre C, Djavaheri-Mergny M, Pattingre S, Giuriato S. [The yin and the yang of autophagy in cancer cells]. *Medecine sciences : M/S*. 2017;33(3):328-34.
184. Hou J, Han Z, Zhao N, Wei L. Autophagy and Tumour Metastasis. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1207:315-38.
185. Galavotti S, Bartesaghi S, Faccenda D, Shaked-Rabi M, Sanzone S, McEvoy A, et al. The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene*. 2013;32(6):699-712.

186. Peng YF, Shi YH, Shen YH, Ding ZB, Ke AW, Zhou J, et al. Promoting colonization in metastatic HCC cells by modulation of autophagy. *PLoS One*. 2013;8(9):e74407.
187. Peng YF, Shi YH, Ding ZB, Ke AW, Gu CY, Hui B, et al. Autophagy inhibition suppresses pulmonary metastasis of HCC in mice via impairing anoikis resistance and colonization of HCC cells. *Autophagy*. 2013;9(12):2056-68.
188. Condello M, Mancini G, Meschini S. The Exploitation of Liposomes in the Inhibition of Autophagy to Defeat Drug Resistance. *Front Pharmacol*. 2020;11:787.
189. Gotink KJ, Broxterman HJ, Labots M, de Haas RR, Dekker H, Honeywell RJ, et al. Lysosomal sequestration of sunitinib: a novel mechanism of drug resistance. *Clin Cancer Res*. 2011;17(23):7337-46.
190. Zhitomirsky B, Assaraf YG. Lysosomal sequestration of hydrophobic weak base chemotherapeutics triggers lysosomal biogenesis and lysosome-dependent cancer multidrug resistance. *Oncotarget*. 2015;6(2):1143-56.
191. Zhitomirsky B, Yunaev A, Kreiserman R, Kaplan A, Stark M, Assaraf YG. Lysosomotropic drugs activate TFEB via lysosomal membrane fluidization and consequent inhibition of mTORC1 activity. *Cell Death Dis*. 2018;9(12):1191.
192. Chapuy B, Koch R, Radunski U, Corsham S, Cheong N, Inagaki N, et al. Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration. *Leukemia*. 2008;22(8):1576-86.
193. Chapuy B, Panse M, Radunski U, Koch R, Wenzel D, Inagaki N, et al. ABC transporter A3 facilitates lysosomal sequestration of imatinib and modulates susceptibility of chronic myeloid leukemia cell lines to this drug. *Haematologica*. 2009;94(11):1528-36.
194. Zhitomirsky B, Assaraf YG. Lysosomes as mediators of drug resistance in cancer. *Drug Resist Updat*. 2016;24:23-33.
195. Herlevsen M, Oxford G, Owens CR, Conaway M, Theodorescu D. Depletion of major vault protein increases doxorubicin sensitivity and nuclear accumulation and disrupts its sequestration in lysosomes. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(6):1804-13.

196. Kazmi F, Hensley T, Pope C, Funk RS, Loewen GJ, Buckley DB, et al. Lysosomal sequestration (trapping) of lipophilic amine (cationic amphiphilic) drugs in immortalized human hepatocytes (Fa2N-4 cells). *Drug Metab Dispos.* 2013;41(4):897-905.
197. Zhang LH, Yang AJ, Wang M, Liu W, Wang CY, Xie XF, et al. Enhanced autophagy reveals vulnerability of P-gp mediated epirubicin resistance in triple negative breast cancer cells. *Apoptosis.* 2016;21(4):473-88.
198. Lim SC, Hahm KS, Lee SH, Oh SH. Autophagy involvement in cadmium resistance through induction of multidrug resistance-associated protein and counterbalance of endoplasmic reticulum stress WI38 lung epithelial fibroblast cells. *Toxicology.* 2010;276(1):18-26.
199. Yoon JH, Ahn SG, Lee BH, Jung SH, Oh SH. Role of autophagy in chemoresistance: regulation of the ATM-mediated DNA-damage signaling pathway through activation of DNA-PKcs and PARP-1. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(6):747-57.
200. Mulcahy Levy JM, Thorburn A. Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients. *Cell Death Differ.* 2020;27(3):843-57.
201. Noman MZ, Parpal S, Van Moer K, Xiao M, Yu Y, Viklund J, et al. Inhibition of Vps34 reprograms cold into hot inflamed tumors and improves anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy. *Sci Adv.* 2020;6(18):eaax7881.
202. Dyczynski M, Yu Y, Otrocka M, Parpal S, Braga T, Henley AB, et al. Targeting autophagy by small molecule inhibitors of vacuolar protein sorting 34 (Vps34) improves the sensitivity of breast cancer cells to Sunitinib. *Cancer Lett.* 2018;435:32-43.
203. Takhsha FS, Vangestel C, Tanc M, De Bruycker S, Berg M, Pintelon I, et al. ATG4B Inhibitor UAMC-2526 Potentiates the Chemotherapeutic Effect of Gemcitabine in a Panc02 Mouse Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Front Oncol.* 2021;11:750259.
204. Egan DF, Chun MG, Vamos M, Zou H, Rong J, Miller CJ, et al. Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates. *Molecular cell.* 2015;59(2):285-97.
205. Petherick KJ, Conway OJ, Mpamhanga C, Osborne SA, Kamal A, Saxty B, et al. Pharmacological inhibition of ULK1 kinase blocks mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent autophagy. *J Biol Chem.* 2015;290(18):11376-83.

206. Bedoya V. Effect of chloroquine on malignant lymphoreticular and pigmented cells in vitro. *Cancer research*. 1970;30(5):1262-75.
207. Murakami N, Oyama F, Gu Y, McLennan IS, Nonaka I, Ihara Y. Accumulation of tau in autophagic vacuoles in chloroquine myopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998;57(7):664-73.
208. Briceno E, Reyes S, Sotelo J. Therapy of glioblastoma multiforme improved by the antimutagenic chloroquine. *Neurosurg Focus*. 2003;14(2):e3.
209. Lau B, Crumbaker M, Yam AOW, Marastoni S, Luckhurst M, O'Grady A, et al. A phase I/II study of hydroxychloroquine and suba-itraconazole in men with biochemical relapse of prostate cancer (HITMAN-PC): Dose escalation results. *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(6_suppl):114-.
210. Kaveney AD, Mehnert JM, Tan AR, Aisner J, Moss RA, Gibbon D, et al. A phase I trial of MK-2206 and hydroxychloroquine(HCQ) in solid tumors, melanoma, renal, and prostate cancer to examine the role of autophagy in tumorigenesis. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(15_suppl):TPS2640-TPS.
211. Hu F, Zhao Y, Yu Y, Fang JM, Cui R, Liu ZQ, et al. Docetaxel-mediated autophagy promotes chemoresistance in castration-resistant prostate cancer cells by inhibiting STAT3. *Cancer Lett*. 2018;416:24-30.
212. Nguyen HG, Yang JC, Kung HJ, Shi XB, Tilki D, Lara PN, Jr., et al. Targeting autophagy overcomes Enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cells and improves therapeutic response in a xenograft model. *Oncogene*. 2014;33(36):4521-30.
213. Wang L, Kim D, Wise JTF, Shi X, Zhang Z, DiPaola RS. p62 as a therapeutic target for inhibition of autophagy in prostate cancer. *The Prostate*. 2018;78(5):390-400.
214. Wang Q, He WY, Zeng YZ, Hossain A, Gou X. Inhibiting autophagy overcomes docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer cells. *Int Urol Nephrol*. 2018.
215. Yang YP, Hu LF, Zheng HF, Mao CJ, Hu WD, Xiong KP, et al. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(5):625-35.
216. Pulido M, Roubaud G, Cazeau AL, Mahammed H, Vedrine L, Joly F, et al. Safety and efficacy of tamsirolimus as second line treatment for patients with recurrent bladder cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):194.

217. Barata PC, Cooney M, Mendiratta P, Gupta R, Dreicer R, Garcia JA. Phase I/II study evaluating the safety and clinical efficacy of temsirolimus and bevacizumab in patients with chemotherapy refractory metastatic castration-resistant prostate cancer. *Invest New Drugs*. 2019;37(2):331-7.
218. Akbarzadeh L, Moini Zanjani T, Sabetkasaei M. Comparison of Anticancer Effects of Carbamazepine and Valproic Acid. *Iran Red Crescent Med J*. 2016;18(10):e37230.
219. Wang X, Xiong W, Tang Y. Tunicamycin suppresses breast cancer cell growth and metastasis via regulation of the protein kinase B/nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Oncol Lett*. 2018;15(4):4137-42.
220. You S, Li W, Guan Y. Tunicamycin inhibits colon carcinoma growth and aggressiveness via modulation of the ERK-JNK-mediated AKT/mTOR signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2018;17(3):4203-12.
221. Wu J, Chen S, Liu H, Zhang Z, Ni Z, Chen J, et al. Tunicamycin specifically aggravates ER stress and overcomes chemoresistance in multidrug-resistant gastric cancer cells by inhibiting N-glycosylation. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):272.
222. Kim H, Bernard ME, Flickinger J, Epperly MW, Wang H, Dixon TM, et al. The autophagy-inducing drug carbamazepine is a radiation protector and mitigator. *Int J Radiat Biol*. 2011;87(10):1052-60.
223. Lu J, Zhu L, Zheng LP, Cui Q, Zhu HH, Zhao H, et al. Overexpression of ULK1 Represents a Potential Diagnostic Marker for Clear Cell Renal Carcinoma and the Antitumor Effects of SBI-0206965. *EBioMedicine*. 2018;34:85-93.
224. Cao QH, Liu F, Yang ZL, Fu XH, Yang ZH, Liu Q, et al. Prognostic value of autophagy related proteins ULK1, Beclin 1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG9, ATG10, ATG12, LC3B and p62/SQSTM1 in gastric cancer. *Am J Transl Res*. 2016;8(9):3831-47.
225. Akin D, Wang SK, Habibzadegah-Tari P, Law B, Ostrov D, Li M, et al. A novel ATG4B antagonist inhibits autophagy and has a negative impact on osteosarcoma tumors. *Autophagy*. 2014;10(11):2021-35.
226. Li LQ, Xie WJ, Pan D, Chen H, Zhang L. Inhibition of autophagy by bafilomycin A1 promotes chemosensitivity of gastric cancer cells. *Tumour Biol*. 2016;37(1):653-9.

227. Lu X, Chen L, Chen Y, Shao Q, Qin W. Bafilomycin A1 inhibits the growth and metastatic potential of the BEL-7402 liver cancer and HO-8910 ovarian cancer cell lines and induces alterations in their microRNA expression. *Exp Ther Med*. 2015;10(5):1829-34.
228. Raghavendra AS, Kwiatkowski D, Damodaran S, Kettner NM, Ramirez DL, Gombos DS, et al. Phase I safety and efficacy study of autophagy inhibition with hydroxychloroquine to augment the antiproliferative and biological effects of preoperative palbociclib plus letrozole for estrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer (MBC). *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(15_suppl):1067-.
229. Neal JW, Wakelee HA, Feliciano JL, Goldberg SB, Morgensztern D, Das MS, et al. A multicenter randomized phase II trial of erlotinib with and without hydroxychloroquine (HCQ) in TKI-naive patients (pts) with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutant advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(15_suppl):8088-.
230. Qiang L, Zhao B, Shah P, Sample A, Yang S, He YY. Autophagy positively regulates DNA damage recognition by nucleotide excision repair. *Autophagy*. 2016;12(2):357-68.
231. Hewitt G, Carroll B, Sarallah R, Correia-Melo C, Ogrodnik M, Nelson G, et al. SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair. *Autophagy*. 2016;12(10):1917-30.
232. Lin W, Yuan N, Wang Z, Cao Y, Fang Y, Li X, et al. Autophagy confers DNA damage repair pathways to protect the hematopoietic system from nuclear radiation injury. *Sci Rep*. 2015;5:12362.
233. Park JM, Tougeron D, Huang S, Okamoto K, Sinicrope FA. Beclin 1 and UVRAG confer protection from radiation-induced DNA damage and maintain centrosome stability in colorectal cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(6):e100819.
234. Siggins L, Figg N, Bennett M, Foo R. Nutrient deprivation regulates DNA damage repair in cardiomyocytes via loss of the base-excision repair enzyme OGG1. *FASEB J*. 2012;26(5):2117-24.
235. Xu F, Li X, Yan L, Yuan N, Fang Y, Cao Y, et al. Autophagy Promotes the Repair of Radiation-Induced DNA Damage in Bone Marrow Hematopoietic Cells via Enhanced STAT3 Signaling. *Radiat Res*. 2017;187(3):382-96.

236. Tsuruma R, Ohbayashi N, Kamitani S, Ikeda O, Sato N, Muromoto R, et al. Physical and functional interactions between STAT3 and KAP1. *Oncogene*. 2008;27(21):3054-9.
237. Chen S, Wang C, Sun L, Wang DL, Chen L, Huang Z, et al. RAD6 promotes homologous recombination repair by activating the autophagy-mediated degradation of heterochromatin protein HP1. *Mol Cell Biol*. 2015;35(2):406-16.
238. Sharma A, Alswillah T, Singh K, Chatterjee P, Willard B, Venere M, et al. USP14 regulates DNA damage repair by targeting RNF168-dependent ubiquitination. *Autophagy*. 2018;14(11):1976-90.
239. Wang Y, Zhang N, Zhang L, Li R, Fu W, Ma K, et al. Autophagy Regulates Chromatin Ubiquitination in DNA Damage Response through Elimination of SQSTM1/p62. *Molecular cell*. 2016;63(1):34-48.
240. Ye Y, Lin P, Zhang W, Tan S, Zhou X, Li R, et al. DNA Repair Interacts with Autophagy To Regulate Inflammatory Responses to Pulmonary Hyperoxia. *J Immunol*. 2017;198(7):2844-53.
241. SenGupta T, Torgersen ML, Kassahun H, Vellai T, Simonsen A, Nilsen H. Base excision repair AP endonucleases and mismatch repair act together to induce checkpoint-mediated autophagy. *Nature communications*. 2013;4:2674.
242. Yang Y, He S, Wang Q, Li F, Kwak MJ, Chen S, et al. Autophagic UVRAG Promotes UV-Induced Photolesion Repair by Activation of the CRL4(DDB2) E3 Ligase. *Molecular cell*. 2016;62(4):507-19.
243. Wu CL, Qiang L, Han W, Ming M, Viollet B, He YY. Role of AMPK in UVB-induced DNA damage repair and growth control. *Oncogene*. 2013;32(21):2682-9.
244. Gomes LR, Menck CFM, Leandro GS. Autophagy Roles in the Modulation of DNA Repair Pathways. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11).
245. Liu Y, Song H, Song H, Feng X, Zhou C, Huo Z. Targeting autophagy potentiates the anti-tumor effect of PARP inhibitor in pediatric chronic myeloid leukemia. *AMB Express*. 2019;9(1):108.
246. Santiago-O'Farrill JM, Weroha SJ, Hou X, Oberg AL, Heinzen EP, Maurer MJ, et al. Poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibitors induce autophagy-mediated drug

resistance in ovarian cancer cells, xenografts, and patient-derived xenograft models. *Cancer*. 2020;126(4):894-907.

247. Ren H, Bakas NA, Vamos M, Chaikuad A, Limpert AS, Wimer CD, et al. Design, Synthesis, and Characterization of an Orally Active Dual-Specific ULK1/2 Autophagy Inhibitor that Synergizes with the PARP Inhibitor Olaparib for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *J Med Chem*. 2020;63(23):14609-25.

248. Wang K, Zheng J. Knockdown of BAG3 synergizes with olaparib to kill ovarian cancer cells via repressing autophagy. *J Investig Med*. 2020.

249. Zai W, Chen W, Han Y, Wu Z, Fan J, Zhang X, et al. Targeting PARP and autophagy evoked synergistic lethality in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2020;41(3):345-57.

250. Cahuzac M, Langlois P, Péant B, Fleury H, Mes-Masson A-M, Saad F. Pre-activation of autophagy impacts response to olaparib in prostate cancer cells. *Communications Biology*. 2022;5(1):251.

251. Kaminsky VO, Piskunova T, Zborovskaya IB, Tchevkina EM, Zhivotovsky B. Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and -independent apoptosis by stimulating ROS formation. *Autophagy*. 2012;8(7):1032-44.

252. Lin JF, Lin YC, Tsai TF, Chen HE, Chou KY, Hwang TI. Cisplatin induces protective autophagy through activation of BECN1 in human bladder cancer cells. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:1517-33.

253. Lin YC, Lin JF, Wen SI, Yang SC, Tsai TF, Chen HE, et al. Inhibition of High Basal Level of Autophagy Induces Apoptosis in Human Bladder Cancer Cells. *J Urol*. 2016;195(4 Pt 1):1126-35.

254. Barakat DJ, Mendonca J, Barberi T, Zhang J, Kachhap SK, Paz-Priel I, et al. C/EBPbeta regulates sensitivity to bortezomib in prostate cancer cells by inducing REDD1 and autophagosome-lysosome fusion. *Cancer Lett*. 2016;375(1):152-61.

255. Feiersinger GE, Trattinig K, Leitner PD, Guggenberger F, Oberhuber A, Peer S, et al. Olaparib is effective in combination with, and as maintenance therapy after, first-line endocrine therapy in prostate cancer cells. *Mol Oncol*. 2018;12(4):561-76.

256. Tang MK, Kwong A, Tam KF, Cheung AN, Ngan HY, Xia W, et al. BRCA1 deficiency induces protective autophagy to mitigate stress and provides a mechanism for BRCA1 haploinsufficiency in tumorigenesis. *Cancer Lett.* 2014;346(1):139-47.
257. Nagata Y, Takahashi A, Ohnishi K, Ota I, Ohnishi T, Tojo T, et al. Effect of rapamycin, an mTOR inhibitor, on radiation sensitivity of lung cancer cells having different p53 gene status. *Int J Oncol.* 2010;37(4):1001-10.
258. Eke I, Makinde AY, Aryankalayil MJ, Sandfort V, Palayoor ST, Rath BH, et al. Exploiting Radiation-Induced Signaling to Increase the Susceptibility of Resistant Cancer Cells to Targeted Drugs: AKT and mTOR Inhibitors as an Example. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(2):355-67.
259. Wang D, Gao L, Liu X, Yuan C, Wang G. Improved antitumor effect of ionizing radiation in combination with rapamycin for treating nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Lett.* 2017;14(1):1105-8.
260. Lawrence J, Nho R. The Role of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3).
261. Osoegawa A, Gills JJ, Kawabata S, Dennis PA. Rapamycin sensitizes cancer cells to growth inhibition by the PARP inhibitor olaparib. *Oncotarget.* 2017;8(50):87044-53.
262. Liu EY, Xu N, O'Prey J, Lao LY, Joshi S, Long JS, et al. Loss of autophagy causes a synthetic lethal deficiency in DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(3):773-8.
263. Willmore E, de Caux S, Sunter NJ, Tilby MJ, Jackson GH, Austin CA, et al. A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood.* 2004;103(12):4659-65.
264. Wang R, Yu Z, Sunchu B, Shoaf J, Dang I, Zhao S, et al. Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism. *Aging Cell.* 2017;16(3):564-74.
265. Pankiv S, Lamark T, Bruun JA, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *J Biol Chem.* 2010;285(8):5941-53.
266. Wooten MW, Geetha T, Seibenhener ML, Babu JR, Diaz-Meco MT, Moscat J. The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF-kappaB activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *J Biol Chem.* 2005;280(42):35625-9.

267. Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, et al. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Molecular cell*. 2013;51(5):618-31.
268. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol*. 2004;24(16):7130-9.
269. Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem*. 2002;277(45):42769-74.
270. Sun X, Wang Y, Ji K, Liu Y, Kong Y, Nie S, et al. NRF2 preserves genomic integrity by facilitating ATR activation and G2 cell cycle arrest. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(16):9109-23.
271. Lobry C, Weil R. [Regulation of NF-kappaB pathway in T lymphocytes]. *Medecine sciences : M/S*. 2007;23(10):857-61.
272. Volcic M, Karl S, Baumann B, Salles D, Daniel P, Fulda S, et al. NF-kappaB regulates DNA double-strand break repair in conjunction with BRCA1-CtIP complexes. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(1):181-95.
273. Pishas KI, Cowley KJ, Pandey A, Hoang T, Beach JA, Luu J, et al. Phenotypic Consequences of SLC25A40-ABCB1 Fusions beyond Drug Resistance in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(22).
274. Naik PP, Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das CK, Mishra R, et al. Autophagy regulates cisplatin-induced stemness and chemoresistance via the upregulation of CD44, ABCB1 and ADAM17 in oral squamous cell carcinoma. *Cell Prolif*. 2018;51(1).
275. Lombard AP, Liu C, Armstrong CM, D'Abronzio LS, Lou W, Chen H, et al. Overexpressed ABCB1 Induces Olaparib-Taxane Cross-Resistance in Advanced Prostate Cancer. *Transl Oncol*. 2019;12(7):871-8.
276. Ouyang DY, Xu LH, He XH, Zhang YT, Zeng LH, Cai JY, et al. Autophagy is differentially induced in prostate cancer LNCaP, DU145 and PC-3 cells via distinct splicing profiles of ATG5. *Autophagy*. 2013;9(1):20-32.

277. Humbert M, Moran M, de la Cruz-Ojeda P, Muntane J, Wiedmer T, Apostolova N, et al. Assessing Autophagy in Archived Tissue or How to Capture Autophagic Flux from a Tissue Snapshot. *Biology (Basel)*. 2020;9(3).
278. Astolfi M, Peant B, Lateef MA, Rousset N, Kendall-Dupont J, Carmona E, et al. Micro-dissected tumor tissues on chip: an ex vivo method for drug testing and personalized therapy. *Lab on a chip*. 2016;16(2):312-25.
279. Simeone K, Guay-Lord R, Lateef MA, Peant B, Kendall-Dupont J, Orimoto AM, et al. Paraffin-embedding lithography and micro-dissected tissue micro-arrays: tools for biological and pharmacological analysis of ex vivo solid tumors. *Lab on a chip*. 2019;19(4):693-705.
280. Tanida I, Waguri S. Measurement of autophagy in cells and tissues. *Methods Mol Biol*. 2010;648:193-214.
281. McDermott M, Eustace AJ, Busschots S, Breen L, Crown J, Clynes M, et al. In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Front Oncol*. 2014;4:40.
282. Zuo Q, Liu J, Zhang J, Wu M, Guo L, Liao W. Development of trastuzumab-resistant human gastric carcinoma cell lines and mechanisms of drug resistance. *Sci Rep*. 2015;5:11634.
283. Farkkila A, Rodriguez A, Oikkonen J, Gulhan DC, Nguyen H, Dominguez J, et al. Heterogeneity and Clonal Evolution of Acquired PARP Inhibitor Resistance in TP53- and BRCA1-Deficient Cells. *Cancer research*. 2021;81(10):2774-87.
284. Sherman-Baust CA, Becker KG, Wood III WH, Zhang Y, Morin PJ. Gene expression and pathway analysis of ovarian cancer cells selected for resistance to cisplatin, paclitaxel, or doxorubicin. *J Ovarian Res*. 2011;4(1):21.
285. Dong Y, Hakimi MA, Chen X, Kumaraswamy E, Cooch NS, Godwin AK, et al. Regulation of BRCC, a holoenzyme complex containing BRCA1 and BRCA2, by a signalosome-like subunit and its role in DNA repair. *Molecular cell*. 2003;12(5):1087-99.
286. Chen L, Huang S, Lee L, Davalos A, Schiestl RH, Campisi J, et al. WRN, the protein deficient in Werner syndrome, plays a critical structural role in optimizing DNA repair. *Aging Cell*. 2003;2(4):191-9.

287. Tanaka K, Miura N, Satokata I, Miyamoto I, Yoshida MC, Satoh Y, et al. Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. *Nature*. 1990;348(6296):73-6.
288. Perez-Oliva AB, Lachaud C, Szyniarowski P, Munoz I, Macartney T, Hickson I, et al. USP45 deubiquitylase controls ERCC1-XPF endonuclease-mediated DNA damage responses. *EMBO J*. 2015;34(3):326-43.
289. Tu Z, Xu B, Qu C, Tao Y, Chen C, Hua W, et al. BRCC3 acts as a prognostic marker in nasopharyngeal carcinoma patients treated with radiotherapy and mediates radiation resistance in vitro. *Radiat Oncol*. 2015;10:123.
290. Chen X, Arciero CA, Wang C, Broccoli D, Godwin AK. BRCC36 is essential for ionizing radiation-induced BRCA1 phosphorylation and nuclear foci formation. *Cancer research*. 2006;66(10):5039-46.
291. Edwards SL, Brough R, Lord CJ, Natrajan R, Vatcheva R, Levine DA, et al. Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature*. 2008;451(7182):1111-5.
292. Cierna Z, Miskovska V, Roska J, Jurkovicova D, Pulzova LB, Sestakova Z, et al. Increased levels of XPA might be the basis of cisplatin resistance in germ cell tumours. *BMC Cancer*. 2020;20(1):17.
293. Pajuelo-Lozano N, Bargiela-Iparraguirre J, Dominguez G, Quiroga AG, Perona R, Sanchez-Perez I. XPA, XPC, and XPD Modulate Sensitivity in Gastric Cisplatin Resistance Cancer Cells. *Front Pharmacol*. 2018;9:1197.
294. Chiu TJ, Chen CH, Chien CY, Li SH, Tsai HT, Chen YJ. High ERCC1 expression predicts cisplatin-based chemotherapy resistance and poor outcome in unresectable squamous cell carcinoma of head and neck in a betel-chewing area. *J Transl Med*. 2011;9:31.
295. Du P, Wang Y, Chen L, Gan Y, Wu Q. High ERCC1 expression is associated with platinum-resistance, but not survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Oncol Lett*. 2016;12(2):857-62.
296. Mesquita KA, Alabdullah M, Griffin M, Toss MS, Fatah T, Alblihy A, et al. ERCC1-XPF deficiency is a predictor of olaparib induced synthetic lethality and platinum sensitivity in epithelial ovarian cancers. *Gynecol Oncol*. 2019;153(2):416-24.

297. Postel-Vinay S, Bajrami I, Friboulet L, Elliott R, Fontebasso Y, Dorvault N, et al. A high-throughput screen identifies PARP1/2 inhibitors as a potential therapy for ERCC1-deficient non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2013;32(47):5377-87.
298. Cheng H, Zhang Z, Borczuk A, Powell CA, Balajee AS, Lieberman HB, et al. PARP inhibition selectively increases sensitivity to cisplatin in ERCC1-low non-small cell lung cancer cells. *Carcinogenesis*. 2013;34(4):739-49.
299. Pranatharthi A, Thomas P, Udayashankar AH, Bhavani C, Suresh SB, Krishna S, et al. RhoC regulates radioresistance via crosstalk of ROCK2 with the DNA repair machinery in cervical cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):392.
300. Zhang X, Li T, Yang M, Du Q, Wang R, Fu B, et al. Acquired temozolomide resistance in MGMT(low) gliomas is associated with regulation of homologous recombination repair by ROCK2. *Cell Death Dis*. 2022;13(2):138.
301. Zhou Y, Zhou Y, Wang K, Li T, Zhang M, Yang Y, et al. ROCK2 Confers Acquired Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer Cells by Upregulating Transcription Factor ZEB1. *Cancers (Basel)*. 2019;11(12).
302. Zhang P, Wei Y, Wang L, Debeb BG, Yuan Y, Zhang J, et al. ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nat Cell Biol*. 2014;16(9):864-75.
303. Malaquin N, Martinez A, Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol*. 2016;82:39-49.
304. Niklander S, Bandaru D, Lambert DW, Hunter KD. ROCK inhibition modulates the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in oral keratinocytes. *FEBS Open Bio*. 2020;10(12):2740-9.
305. Goyal P, Brunnert D, Ehrhardt J, Bredow M, Piccenini S, Zygmunt M. Cytokine IL-6 secretion by trophoblasts regulated via sphingosine-1-phosphate receptor 2 involving Rho/Rho-kinase and Rac1 signaling pathways. *Mol Hum Reprod*. 2013;19(8):528-38.

306. Fleury H, Malaquin N, Tu V, Gilbert S, Martinez A, Olivier MA, et al. Exploiting interconnected synthetic lethal interactions between PARP inhibition and cancer cell reversible senescence. *Nature communications*. 2019;10(1):2556.
307. Mongelli A, Atlante S, Barbi V, Bachetti T, Martelli F, Farsetti A, et al. Treating Senescence like Cancer: Novel Perspectives in Senotherapy of Chronic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).
308. Simay Demir YD, Ozdemir A, Sucularli C, Benhur E, Ark M. The implication of ROCK 2 as a potential senotherapeutic target via the suppression of the harmful effects of the SASP: Do senescent cancer cells really engulf the other cells? *Cell Signal*. 2021;84:110007.
309. Antolin AA, Mestres J. Dual Inhibitors of PARPs and ROCKs. *ACS Omega*. 2018;3(10):12707-12.
310. Demirci D, Dayanc B, Mazi FA, Senturk S. The Jekyll and Hyde of Cellular Senescence in Cancer. *Cells*. 2021;10(2).
311. Wang Z, Gao J, Zhou J, Liu H, Xu C. Olaparib induced senescence under P16 or P53 dependent manner in ovarian cancer. *J Gynecol Oncol*. 2019;30(2):e26.
312. Velikkakath AK, Nishimura T, Oita E, Ishihara N, Mizushima N. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol Biol Cell*. 2012;23(5):896-909.
313. Gao S, Wang K, Wang X. miR-375 targeting autophagy-related 2B (ATG2B) suppresses autophagy and tumorigenesis in cisplatin-resistant osteosarcoma cells. *Neoplasma*. 2020;67(4):724-34.
314. Zhang J, Chen K, Tang Y, Luan X, Zheng X, Lu X, et al. LncRNA-HOTAIR activates autophagy and promotes the imatinib resistance of gastrointestinal stromal tumor cells through a mechanism involving the miR-130a/ATG2B pathway. *Cell Death Dis*. 2021;12(4):367.
315. Kovaleva V, Mora R, Park YJ, Plass C, Chiramel AI, Bartenschlager R, et al. miRNA-130a targets ATG2B and DICER1 to inhibit autophagy and trigger killing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Cancer research*. 2012;72(7):1763-72.
316. Poodineh J, Sirati-Sabet M, Rajabibazl M, Mohammadi-Yeganeh S. MiR-130a-3p blocks Wnt signaling cascade in the triple-negative breast cancer by targeting the key players at multiple points. *Heliyon*. 2020;6(11):e05434.

317. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D127-D31.
318. Gibbings D, Mostowy S, Jay F, Schwab Y, Cossart P, Voinnet O. Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nat Cell Biol.* 2012;14(12):1314-21.
319. Vescarelli E, Gerini G, Megiorni F, Anastasiadou E, Pontecorvi P, Solito L, et al. MiR-200c sensitizes Olaparib-resistant ovarian cancer cells by targeting Neuropilin 1. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1):3.
320. Zhong Q, Xiong Y, Ling C, Qian Y, Zhao X, Yang H. Enhancing the sensitivity of ovarian cancer cells to olaparib via microRNA-20b-mediated cyclin D1 targeting. *Exp Biol Med (Maywood).* 2021;246(11):1297-306.
321. Zhao M, Sun B, Wang Y, Qu G, Yang H, Wang P. miR-27-3p Enhances the Sensitivity of Triple-Negative Breast Cancer Cells to the Antitumor Agent Olaparib by Targeting PSEN-1, the Catalytic Subunit of Gamma-Secretase. *Front Oncol.* 2021;11:694491.
322. Dasgupta I, Chatterjee A. Recent Advances in miRNA Delivery Systems. *Methods Protoc.* 2021;4(1).
323. Cardoso CM, Groth-Pedersen L, Hoyer-Hansen M, Kirkegaard T, Corcelle E, Andersen JS, et al. Depletion of kinesin 5B affects lysosomal distribution and stability and induces peri-nuclear accumulation of autophagosomes in cancer cells. *PLoS One.* 2009;4(2):e4424.
324. Wang IH, Chen YJ, Hsu JW, Lee FJ. The Arl3 and Arl1 GTPases co-operate with Cog8 to regulate selective autophagy via Atg9 trafficking. *Traffic.* 2017;18(9):580-9.
325. Luo G, Sun Y, Feng R, Zhao Q, Wen T. ARL3 subcellular localization and its suspected role in autophagy. *Biochimie.* 2018;154:187-93.
326. Hu H, Wang M, Guan X, Yuan Z, Liu Z, Zou C, et al. Loss of ABCB4 attenuates the caspase-dependent apoptosis regulating resistance to 5-Fu in colorectal cancer. *Biosci Rep.* 2018;38(1).
327. Zhang XJ, Yang L, Zhao Q, Caen JP, He HY, Jin QH, et al. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ.* 2002;9(8):790-800.
328. John K, Alla V, Meier C, Putzer BM. GRAMD4 mimics p53 and mediates the apoptotic function of p73 at mitochondria. *Cell Death Differ.* 2011;18(5):874-86.

329. Hu L, Li H, Zi M, Li W, Liu J, Yang Y, et al. Why Senescent Cells Are Resistant to Apoptosis: An Insight for Senolytic Development. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:822816.
330. Gimenez-Bonafe P, Tortosa A, Perez-Tomas R. Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. *Curr Cancer Drug Targets.* 2009;9(3):320-40.
331. Yokoyama T, Kohn EC, Brill E, Lee JM. Apoptosis is augmented in high-grade serous ovarian cancer by the combined inhibition of Bcl-2/Bcl-xL and PARP. *Int J Oncol.* 2017;50(4):1064-74.
332. Soto-Gamez A, Wang Y, Zhou X, Seras L, Quax W, Demaria M. Enhanced extrinsic apoptosis of therapy-induced senescent cancer cells using a death receptor 5 (DR5) selective agonist. *Cancer Lett.* 2022;525:67-75.

Annexes

Figures Supplémentaires

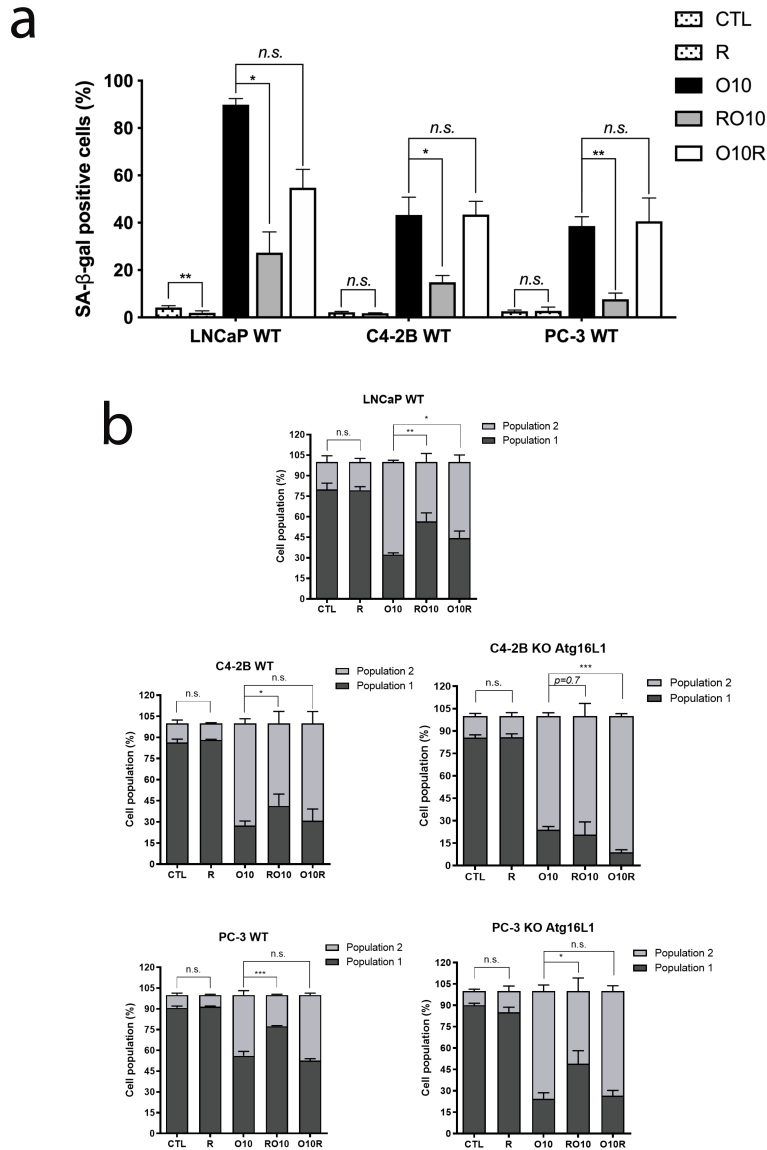


Figure 10. – La pré-activation d'autophagie réduit les effets de l'olaparib sur l'activité SA-B-Gal et la morphologie cellulaire.

a. Mesure de l'activité SA-B-Gal des lignées PC WT. **b.** Mesure de la taille cellulaire par cytométrie en flux dans les mêmes lignées WT et C4-2B et PC-3 KO Atg16L1. N=3, Student t test. n.s. = non-significant. *p < 0.05 et **p < 0.01.

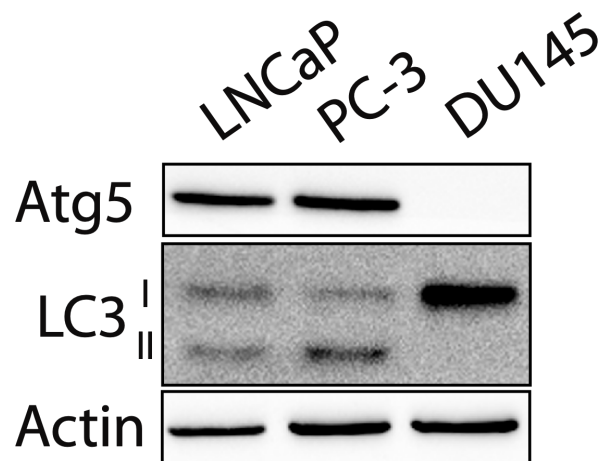


Figure 11. – Les DU145 n’expriment pas Atg5 et LC3-II.

Mesure de l’expression d’Atg5 et LC3 par Western blot dans les LNCaP, PC-3 et DU145.

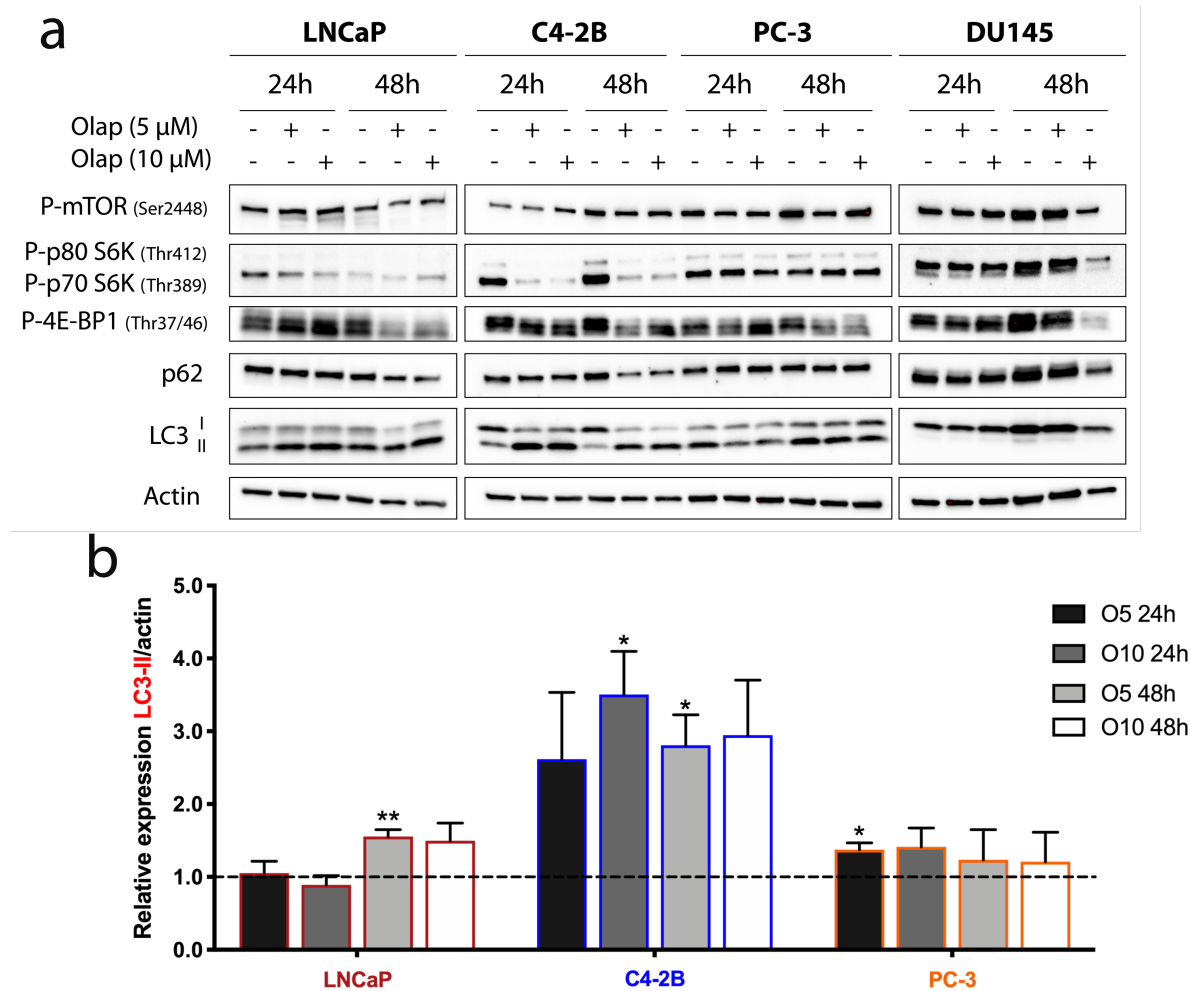


Figure 12. – Induction de l'autophagie dans les lignées du cancer la prostate.

a. Mesure d'induction d'autophagie par Western blot après 24h et 48h de traitement à 5 et 10 μ M d'olaparib. **b.** Quantification de **a.** réalisée avec ImageJ. N=3, Student t test. n.s. = non-significant. *p < 0.05 et **p < 0.01.