





UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

INSERM UMR 1069 « Nutrition Croissance et Cancer »



Julie DARTIER

soutenue le : 14 décembre 2016

pour obtenir le grade de : Docteur de l'université François – Rabelais de Tours

Discipline/ Spécialité : Science de la Vie et de la Santé

ETUDE DU METABOLISME ENERGETIQUE MITOCHONDRIAL ET DES CARDIOLIPINES DANS LA RESISTANCE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES A LA DOXORUBICINE

THÈSE dirigée par : M DUMAS Jean-François	Maitre de conférence, HDR, Université François – Rabelais de Tours
RAPPORTEURS : M CHEVROLLIER Arnaud M MARCHETTI Philipe	Maitre de conférence, HDR, Université d'Angers Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, HDR, Université de Lille
JURY :	
M CHEVROLLIER Arnaud	Maitre de conférence, Université d'Angers
M DUMAS Jean-François	Maitre de conférence, HDR, Université François – Rabelais de Tours
M JUIN Philippe	Directeur de Recherche, Centre de Recherche en Cancérologie
	Nantes-Angers, Nantes
Mme MAHEO Karine	Professeur des Universités, Université François-Rabelais de Tours
M MARCHETTI Philipe	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, HDR, Université de Lille
Mme VIGNAIS Marie-Luce	Chargé de Recherche, CNRS, Université de Montpellier

A ma famille(s),

Remerciements

Mes premiers remerciements vont au Dr Arnaud Chevrollier, au Dr Philippe Juin, au Dr Philippe Marchetti et au Dr Marie-Luce Vignais pour avoir accepté de juger ce travail de thèse. Merci d'avoir pris de votre temps pour lire cette thèse et d'avoir participé au jury.

Je remercie ensuite les Pr Philippe Bougnoux et Stephan Chevalier, directeurs successifs du laboratoire de m'avoir accueillie au sein de l'unité de recherche « Nutrition, Croissance et Cancer » pour mon stage de DUT, de M2 puis de thèse.

Je remercie ensuite mon directeur de thèse le Dr Jean-François Dumas et ma « co-encadrante non officielle » le Pr Karine Mahéo pour leur confiance accordée et leur disponibilité. Merci pour vos conseils et votre soutien durant ces 3 ans (et demi). Jean-François, j'espère que ta première expérience en tant que directeur de thèse ne t'a pas trop effrayé... Karine, merci de m'avoir fait découvrir les « joies » du DHA et promis j'arrete les schémas avec des flèches après la soutenance.

Elsa, je te remercie pour ton aide précieuse durant ces quelques années passées à maniper ensemble. On formait un assez bon duo. Je te souhaite du bonheur dans ta nouvelle vie parisienne et plein de nouveaux poissons !!

Michelle Pinault, Cyrille Guimaraes et Violette Guérin, je vous remercie pour votre aide pour le Bligh et Dyer et le dosage des cardiolipines et autres phospholipides cellulaires. Je remercie au passage les stagiaires de biochimie qui ont pu aussi participer au projet.

Je remercie Julien Burlaud-Gaillard pour m'avoir donné de son temps et de sa disponibilité pour la microscopie électronique et confocale.

Merci à tous les stagiaires que j'ai pu encadrer et en particulier Angélina Acier. J'espère vous avoir donné envie de continuer et que vous garderez un bon souvenir de votre expérience au laboratoire.

Je ne suis pas très douée pour écrire les choses que je ressens mais je vais faire de mon mieux. Au tour maintenant des membres du laboratoire. D'abord les chefs : Stéphane, pour les conseils sur la mitochondrie et tes petits goûters improvisés au laboratoire. Sébastien et Marie, merci pour votre humour pas toujours très distingué mais tellement drôle. Pierre, pour tes conseils et tes mails enragés, Christophe, merci pour la découverte du monde merveilleux des canaux ioniques. Merci aussi à Aurélie pour ton aide en biologie moléculaire, Karo, Philippe, Gunther. En espérant n'avoir oublié personne. Romain, merci pour ton soutien durant cette période de rédaction, merci pour ton écoute, merci pour tout.

Isabelle et Catherine, merci pour votre travail au quotidien dans le laboratoire. Issa merci pour ton aide en culture cellulaire et Cath merci pour ton travail qui est indispensable pour faire tourner la boutique correctement (et merci pour les commandes en dehors des jours réservés).

Viens le tour des thésards.

Les anciens : Mimsy, pour m'avoir fait découvrir la mitochondrie durant mon stage de DUT. Laure, mon ancienne collègue du team « mitochondrie » merci pour tes conseils et ton aide. Je te souhaite de la réussite pour ton post-doc et du bonheur en privé. Audrey, merci pour toutes les fois où tu n'as pas compris et plus sérieusement je te souhaite plein de bonheur dans ta reconversion. Maxime, entre nous c'était le choc de deux cultures (mitochondrie et canaux) mais au final on va en sortir quelque chose, tu vas voir, malgrés. Lucie B, merci juste de m'avoir écouté et conseillé. Et enfin Emeline, merci d'avoir été là durant cette période difficile de rédaction, merci pour ton soutien, tes conseils et merci d'avoir su m'écouter quand j'en avais besoin.

Les nouveaux : Fred, Yann et Bruno ; l'an prochain c'est votre tour. Je vous souhaite plein de nouveaux résultats et du courage pour la fin de thèse. Céline, on n'a pas eu l'occasion de beaucoup discuter mais j'ai apprécié tous ces petits moments. Adeline, tu es la dernière représentante de la « mitochondrie », fais-nous honneur. Merci d'avoir été là quand ça n'allait pas. Entre nous ce ne sont pas des adieux mais un au revoir car rendez-vous en tenue de « princesse » pour un petit cours de zumba-step. Sandy, Delphine, Lucille, Chahrazed, Sana, bon courage pour la suite.

Maintenant les amis de toujours. En premier lieu, désolée de ne pas avoir été très présente pendant ces derniers mois mais maintenant on va pouvoir rattraper le temps perdu.

Christelle, ma petite Chrimouth déjà 10 ans que tu me supportes ou inversement. Je te promets d'être maintenant beaucoup plus disponible et de m'investir à fond dans la dure tâche que tu

m'as confiée. Pas besoin de te souhaiter du bonheur dans la vie privée, tu es déjà au maximum je pense. Kevin, merci pour ton amitié qui dure depuis un moment maintenant. Merci pour ton écoute. Je te souhaite de la réussite et du bonheur auprès d'Amaélys. Arthur, que tu as bien grandi depuis notre rencontre. Je te remercie pour les soirées chez toi durant les vacances, elles peuvent parfois cacher d'agréable et douce surprise.

Merci à Antoine, Cassandre, Marie et Marie du club pour vos sourires et votre chaleurosité.

En dernier, je tiens à remercier ma famille de tout cœur, Papa et Maman merci d'avoir cru en moi et soutenu durant toutes ces années. Nicolas, Kelly et Eugène merci pour votre bonheur. Et enfin, merci à Nicocolas. Pas besoin d'écrire de remerciements je t'ai déjà tout dit.

Résumé

La forte mortalité associée au cancer du sein est en partie dépendante de l'échec de certaines chimiothérapies anticancéreuses, telles que la doxorubicine, du fait de la résistance développée par les cellules tumorales et des effets secondaires délétères tels que la cardiotoxicité. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le phénomène de chimiorésistance. Il semble notamment que la mitochondrie du fait de sa participation dans la production d'énergie et dans la mort cellulaire, joue un rôle important dans la résistance des cellules cancéreuses. Les cardiolipines (CL) sont des phospholipides spécifiques des membranes mitochondriales et sont étroitement impliquées dans les différentes fonctions mitochondriales. Quelques études récentes montrent la présence de différentes pompes d'efflux ATP-dépendantes au sein des mitochondries de diverses cellules cancéreuses et leur implication dans l'efflux des drogues en dehors des mitochondries.

Ce travail de thèse avait pour but global de mieux comprendre le rôle de la mitochondrie et du métabolisme des CL dans la résistance des cellules cancéreuses mammaires à la doxorubicine avec l'objectif d'identifier des cibles/mécanismes mitochondriaux impliqués dans la réponse à la drogue. Les objectifs particuliers de ce travail ont été (1) d'identifier des acteurs clés du métabolisme énergétique mitochondrial et du métabolisme des CL impliqués dans la résistance des cellules cancéreuses mammaires à la doxorubicine et (2) d'étudier la présence et l'activité de pompes d'efflux ATP-dépendantes dans les mitochondries de cellules résistantes et leur lien avec la synthèse d'ATP mitochondriale. Pour cela, deux lignées cancéreuses mammaires : une lignée résistante à la doxorubicine (MCF-7dox) et une lignée sensible (MCF-7) ont été utilisées.

Nos résultats montrent que les mitochondries des cellules MCF-7dox présentent (1) un meilleur rendement de l'efficacité de la synthèse d'ATP mitochondriale, (2) une diminution de l'activité du complexe I de la chaine respiratoire mitochondriale associée à un défaut de l'assemblage de ce complexe et une diminution de la quantité de supercomplexes contenant le complexe I, (3) une moindre production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) en réponse à la doxorubicine liée à un plus faible cycle redox de cette molécule par le complexe I, (4) une plus faible susceptibilité d'ouverture du pore de transition de perméabilité en réponse à la doxorubicine et (5) une plus faible quantité de CL associée à un plus forte quantité de MLCL, la forme immature des CL. De plus, l'inhibition du complexe I par la roténone ou l'hypoxie diminue la sensibilité des cellules MCF-7 à la doxorubicine. Ces travaux montrent aussi que l'accumulation intramitochondriale de doxorubicine dans les cellules MCF-7dox est

plus faible que celle retrouvée dans les cellules MCF-7 du fait de la présence dans leurs mitochondries de deux pompes d'efflux ATP-dépendantes (BCRP et MRP1) dont l'activité d'efflux dépend en partie de la synthèse d'ATP mitochondriale.

De précédents travaux réalisés au sein du laboratoire ont mis en évidence que les acides gras polyinsaturés oméga-3 (AGPI n-3), améliorent l'efficacité des thérapies anticancéreuses par un mécanisme impliquant un stress oxydant cellulaire. Ce travail de thèse avait aussi pour objectif d'identifier des cibles/mécanismes mitochondriaux impliqués dans la résistance des cellules MCF-7dox et sensibles à l'acide docosahexaénoique (DHA), un des principaux AGPI n-3.

Nos résultats montrent que dans les cellules MCF-7dox, l'effet sensibilisant du DHA est inhibé par le MitoTEMPO, un antioxydant mitochondrial et s'accompagne d'une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP. De plus le DHA modifie la composition en acides gras des CL de manière similaire entre les cellules MCF-7 et les cellules MCF-7dox. En revanche, la quantité de CL n'est pas modifiée par le DHA.

L'ensemble de nos résultats suggère que le métabolisme énergétique mitochondrial en relation étroite avec le métabolisme des CL joue un rôle important dans la résistance des cellules cancéreuses mammaires à la doxorubicine.

Mots clés : AGPI n-3, Cardiolipines, Doxorubicine, Métabolisme énergétique mitochondrial, Pompes d'efflux ATP-dépendantes

Résumé en anglais

Breast cancer mortality rates are partly dependent on the failure of certain cancer chemotherapies such as doxorubicin. Accordingly, these treatments are associated with tumor resistance and deleterious side effects such as cardiotoxicity. Several mechanisms have been proposed to explain the phenomenon of drug resistance. The mitochondrion, due to its participation to energy production and to the regulation of cell death, plays a particularly important role in the development of cancer cell resistance. Cardiolipins (CL) are specific mitochondrial membrane phospholipids that are closely implicated in several mitochondrial functions. Recent studies have shown the presence of different ATP-dependent efflux pumps in the mitochondria of various cancer cells. Importantly, their involvement in drug efflux outside mitochondria has been demonstrated.

The overall objective of the study was to better understand the role of mitochondria and CL metabolism in the resistance of breast cancer cells to doxorubicin. The goal was to identify new target/mitochondrial mechanisms implicated in the regulation of drug response. The specific objectives of this study were (1) to identify key players in mitochondrial energy and CL metabolism implicated in the resistance of breast cancer cells to doxorubicin and (2) to study the presence and activity of ATP-dependent efflux pumps in mitochondria from resistant cells and their connection with the synthesis of mitochondrial ATP. For this purpose, we used two breast cancer cell lines: a cell line resistant to doxorubicin (MCF-7dox) and a cell line sensitive to doxorubicine (MCF-7).

Our results show that mitochondria from MCF-7dox cells display (1) more efficient ATP synthesis, (2) a decreased activity of complex I of the mitochondrial respiratory chain associated with a dysfunctional complex I assembly and a decrease in the amount of supercomplexes containing complex I, (3) a reduced production of reactive oxygen species (ROS) in response to doxorubicin linked to a low redox cycle of doxorubicin by complex I, (4) a lower susceptibility to opening of the permeability transition pore in response to doxorubicin and (5) reduced levels of CL with a greater amount of MLCL, which is the immature form of CL. Consistent with these findings, we observed that inhibition of complex I by rotenone or hypoxia decreases the sensitivity of MCF-7 cells to doxorubicin. These studies also show that intra-mitochondrial accumulation of doxorubicin in MCF-7dox cells is reduced compared to that observed in MCF-7 cells due to the presence in their mitochondria of two ATP-dependent efflux pumps (BCRP and MRP1) which efflux activity depends, in part, on the synthesis of mitochondrial ATP.

Previous work conducted in the laboratory have shown that omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA), can improve the effectiveness of cancer therapies by a mechanism involving cellular oxidative stress. Therefore, this work also aimed at identifying target/mitochondrial mechanisms involved in the resistance of MCF-7dox cells and their sensitivity to doxosahexaenoic acid (DHA), a major n-3 PUFA.

Our results show that in MCF-7dox cells, the sensitizing effect of DHA is inhibited by the mitochondrial antioxidant MitoTEMPO, and is accompanied by a decreased ATP synthesis efficiency. Moreover, DHA alters CL fatty acid composition similarly in both MCF-7 cells and MCF-7dox cells. In contrast, CL levels were unchanged by DHA.

Taken together, our results suggest that mitochondrial energy metabolism in association with CL metabolism plays an important role in the development of breast cancer cell resistance to doxorubicin.

Keywords: n-3 PUFA, Cardiolipins, Doxorubicin, Mitochondrial energy metabolism, ATPbinding cassette protein

Table des matières

Remerciements	3 -
Résumé	6 -
Résumé en anglais	8 -
Table des matières	10 -
Liste des tableaux	13 -
Liste des figures	14 -
Liste des annexes	17 -
Liste des abréviations	18 -
Chapitre I : Introduction	21 -
A. La mitochondrie	22 -
a. Structure de la mitochondrie	22 -
b. La phosphorylation oxydative	25 -
c. La production d'ERO mitochondriale	34 -
d. La mort cellulaire	37 -
B. Les cardiolipines	45 -
a. Structure des cardiolipines	45 -
b. Métabolisme des cardiolipines	46 -
c. Cardiolipines et fonctions mitochondriales	50 -
C. Le cancer du sein et la doxorubicine	58 -
a. Le cancer du sein	58 -
b. La doxorubicine	62 -
D. Relations mitochondrie et cancer	69 -
a. Métabolisme mitochondrial et résistance aux traitements thérapeutiques	69 -
b. Stress oxydant et résistance aux traitements thérapeutiques	73 -
c. Mort cellulaire et résistance aux traitements	77 -
d. Pompes d'efflux et résistance aux traitements	79 -
E. AGPI n-3, chimiosensibilisation et mitochondries	88 -
F. Objectifs du travail de thèse	93 -
Chapitre II : Matériel et Méthodes	96 -
A. Matériel biologique	97 -
a. Lignées cellulaires	97 -
b. Traitement des cellules par le DHA	97 -

c	. Traitement des cellules par des inhibiteurs des complexes respiratoir	es
n	nitochondriaux 98	3 -
d	l. Culture des cellules en hypoxie 99)-
e	. Inhibition de l'expression génique par ARN interférents de la cardiolipine syntha	se
	- 100) -
f.	. Test de viabilité cellulaire 100) -
B.	Etude de la glycolyse « aérobie » 101	l -
a	. Dosage du glucose 101	l -
b	Dosage du lactate 101	l -
C.	Etude du métabolisme mitochondrial 102	2 -
a	. Mesure de la consommation d'oxygène 102	2 -
b	Mesure de la synthèse d'ATP mitochondriale 109)-
с	Mesure de l'efficacité de la phosphorylation oxydative 110) -
d	. Potentiel de membrane mitochondrial 110) -
e	. Mesure de l'ouverture du Pore de Transition de Perméabilité (mPTP) : Rétention	on
с	alcique 111	1 -
f.	. Mesure de la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) par	la
n	nitochondrie 113	3 -
g	Quantification des mitochondries 113	3 -
D.	Isolement des mitochondries de cellules 115	5 -
a	Principe 115	5 -
b	Protocole 116	5 -
E.	Mesure de l'accumulation de doxorubicine sur mitochondries isolées 117	7 -
F.	Etude de la présence des pompes d'efflux au niveau mitochondrial 118	3 -
a	. Etude par microscopie confocale à fluorescence 118	3 -
b	Etude par microscopie multispectrale 119)-
G.	Quantification des phospholipides mitochondriaux 119)-
a	. Extraction des phospholipides 119)-
b	Méthode High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)	1 -
H.	Etude de l'expression protéique 121	1 -
a	. Préparation des échantillons 122	2 -
b	. Séparation des protéines sur gel d'acrylamide 122	2 -
с	. Transfert sur membrane PVDF 123	3 -

d.	Immunomarquage et révélation des protéines d'intérêts	123 -
e.	Détection des protéines	124 -
I. E	Etude de l'expression génique par RT-qPCR	124 -
a.	Principe	124 -
b.	Mode opératoire	125 -
Chapitre	e III : Résultats	127 -
A. A	Article 1 : Rôle du complexe I mitochondrial et du métabolisme des cardio	lipines dans
la rési	stance des cellules cancéreuses mammaires MCF-7dox à la doxorubicine .	128 -
a.	Introduction	128 -
b.	Article	129 -
c.	Résultats complémentaires	168 -
d.	Discussion	171 -
В. <i>А</i>	Article 2 : Implication de l'ATP mitochondrial dans l'activité des pomp	oes d'efflux
retrou	vées dans les mitochondries des cellules cancéreuses mammaires résis	stantes à la
doxor	ubicine, MCF-7dox	176 -
a.	Introduction	176 -
b.	Article	178 -
c.	Discussion	207 -
C. F	Résultats complémentaires : Implication du métabolisme mitochondrial	dans l'effet
chimi	osensibilisant du DHA sur les cellules cancéreuses mammaires	210 -
a.	Introduction	210 -
b.	Résultats	211 -
c.	Discussion et perspectives	220 -
Chapitre	· IV : Conclusion et perspectives générales	224 -
Bibliogr	aphie	230 -
Résumé		
Résumé	en anglais	

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition (%) des membranes externes et internes mitocl	hondriales en
phospholipides	24 -
Tableau 2 : Rôle des CL sur la structure et l'activité des complexes d	u système de
phosphorylation oxydative	52 -
Tableau 3 : Substrats de la P-gp	82 -
Tableau 4 : Substrats du transporteur BCRP	85 -
Tableau 5 : Composition du tampon de respiration avec ou sans ASB	105 -
Tableau 6 : Composition du tampon de rétention calcique	112 -
Tableau 7 : Composition du mélange de réactif pour dosage de la CS	114 -
Tableau 8 : Composition du tampon d'isolement mitochondrial	117 -
Tableau 9 : Composition du tampon de respiration mitochondrial pour n	nitochondries
isolées	118 -
Tableau 10 : Composition du tampon de charge = tampon de Laemli 5X	122 -
Tableau 11 : Composition du tampon d'électrophorèse 10X	123 -
Tableau 12 : Composition du TTBS	123 -
Tableau 13 : Tableaux des anticorps utilisés	124 -
Tableau 14 : Transcription inverse	126 -
Tableau 15 : Séquence des amorces utilisées pour le RT-qPCR (SigmaAldri	ch) 126 -
Tableau 16 : Composition en acides gras des CL dans les mitochondries des	cellules MCF-
7 et MCF-7dox	213 -
Tableau 17 : Composition en acides gras des CL dans un modèle de tumeur	s mammaires
chimio-induites	219 -

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la mitochondrie.	22 -
Figure 2 : Fonctionnement de la phosphorylation oxydative	26 -
Figure 3 : Le cycle Q au niveau du complexe III de la phosphorylation oxydativ	ve. 27 -
Figure 4 : Découplage de la phosphorylation oxydative	31 -
Figure 5 : Modèle d'assemblage des complexes de la phosphorylation	oxydative
mitochondriale	33 -
Figure 6: Répercutions de la perte de l'assemblage des « supercomplexe	s» sur la
mitochondrie	34 -
Figure 7 : Mécanismes de production d'ERO par le complexe I mitochondrial.	36 -
Figure 8 : Mécanismes d'interconnections entre la voie extrinsèque et la voie in	ntrinsèque
de la mort par apoptose	40 -
Figure 9 : Principales étapes du processus de l'autophagie	41 -
Figure 10 : Recrutement de la protéine Parkin et régulation de la mitophagie j	par PINK-
1/Parkin après dépolarisation du potentiel de membrane mitochondriale.	43 -
Figure 11 : Régulation de la mitophagie par des récepteurs auto	phagiques
mitochondriaux	44 -
Figure 12 : Structure de la cardiolipine.	45 -
Figure 13 : Métabolisme des cardiolipines : synthèse de novo et remodelage	47 -
Figure 14 : Biosynthèse <i>de novo</i> des CL.	48 -
Figure 15 : Effets du contenu en CL sur le métabolisme énergétique mitochond	l rial. - 54 -
Figure 16 : Effets des CL sur les différentes fonctions mitochondriales	57 -
Figure 17 : Anatomie du sein.	58 -
Figure 18 : Structure de la doxorubicine.	63 -
Figure 19 : Cycle de réduction de la doxorubicine	64 -
Figure 20 : Mécanismes d'adaptations de la mitochondrie au stress oxydant ind	luit par les
traitements thérapeutiques	77 -
Figure 21 : modèle d'expulsion dit de « l'ATP switch ».	80 -
Figure 22 : Structure de la P-glycoprotéine.	81 -
Figure 23 : Structure du transporteur MRP1.	83 -
Figure 24 : Structure du transporteur BCRP.	85 -
Figure 25 : Synthèse et isoformes des AGPI n-3.	88 -

Figure 26 : Schéma représentatif du protocole de traitement des cellules	par le DHA
	98 -
Figure 27 : Schéma « cellules entières ».	103 -
Figure 28 : Schéma « cellules perméabilisées ».	104 -
Figure 29 : Courbe théorique de la consommation d'oxygène mitoc	chondriales aux
différents états de fonctionnement de la chaîne respiratoire	105 -
Figure 30 : Schéma d'alimentation des complexes respiratoires mitocho	ndriaux selon le
protocole de mesure 1.	108 -
Figure 31 : Schéma d'alimentation des complexes respiratoires mitocho	ndriaux selon le
protocole de mesure 2.	108 -
Figure 32 : Schéma d'alimentation des complexes respiratoires mitocho	ndriaux selon le
protocole de mesure 3	109 -
Figure 33 : Représentation théorique d'une courbe obtenue lors de	e la mesure de
l'ouverture du PTP	112 -
Figure 34 : Protocole d'extraction des lipides par la méthode de Bligh et l	Dyer. 120 -
Figure 35 : Consommation d'oxygène mitochondriale dans les cellules N	ACF-7 après un
prétraitement de 72h à l'aide d'un inhibiteur du complexe IV (KCN	20 μM). - 168 -
Figure 36 : Effet de l'inhibition du complexe IV sur la sensibilité des cell	ules MCF-7 à la
doxorubicine après un prétraitement de 72h par le KCN	168 -
Figure 37 : Consommation d'oxygène mitochondriale dans les cellules N	ACF-7 après un
prétraitement de 72h à l'aide d'inhibiteur du complexe I (roténone)	et du complexe
IV (KCN 20 μM)	169 -
Figure 38 : Effet de l'inhibition des complexes I et IV sur la sensibilité de	es cellules MCF-
7 à la doxorubicine après un prétraitement de 72h par la roténone et	t le KCN 169 -
Figure 39 : Structure du complexe I mitochondrial	173 -
Figure 40 : Schéma hypothétique expliquant le rôle du complexe I mito	chondrial et du
métabolisme des cardiolipines dans la résistance des cellules cancéreu	ises mammaires
MCF-7dox à la doxorubicine	175 -
Figure 41 : Comparaison de l'effet chimiosensibilisant d'une supplémenta	tion par le DHA
sur la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses mammaires MCF-	7 et MCF-7dox.
	211 -
Figure 42 : Effet chimiosensibilisant du DHA en présence d'un antioxydan	ıt mitochondrial
spécifique (MitoTEMPO) sur les cellules MCF-7dox	212 -

Figure 43 : Quantité de CL contenue dans les mitochondries des cellules MCF-7 et MCF-
7dox après supplémentation en DHA pendant 6 jours 213 -
Figure 44 : Mesure du rendement énergétique (ATP produit / Oxygène consommé) dans
les cellules MCF-7 et MCF-7dox après une supplémentation en DHA pendant 6 jours.
- 214 -
Figure 45 : Mesure de la consommation d'oxygène liée au gaspillage énergétique (slip
redox ou proton leak) dans les cellules MCF-7dox après supplémentation ou non par
le DHA durant 6 jours 215 -
Figure 46 : Mesure du potentiel de membrane mitochondriale dans les cellules MCF-7dox
après supplémentation ou non par le DHA durant 6 jours 215 -
Figure 47 : Etude du profil métabolique des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et
MCF-7dox après une supplémentation par le DHA.
Figure 48 : Contenu en ATP intracellulaire dans les cellules MCF-7dox 216 -
Figure 49 : Accumulation intramitochondriale de la doxorubicine dans les mitochondries
des cellules MCF-7dox après 6 jours de traitement par le DHA (30 μ M) ou sans
traitement 217 -
Figure 50 : Quantification des CL dans les tumeurs 218 -
Figure 51 : Mécanismes possibles de sensibilisation du DHA dans les cellules Mcf-7dox.
- 223 -
Figure 52 : Schéma hypothétique du fonctionnement du métabolisme énergétique
mitochondrial dans les cellules MCF-7dox suite à ce travail de thèse 228 -

Liste des annexes

Annexe 1 : Produits utilisés pour l'étude de la bioénergétique mitochondriale	- 256 -
Annexe 2 : Publications et communications	- 257 -

Liste des abréviations

4-HNE : 4-Hydroxynonenal
ADP : Adénosine di-phosphate
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AGPI n-3 : Acides gras polyinsaturés omégas-3
AIF : Apoptosis-inducing factor
ALA : Acide alpha-linolénique
ALCAT : Acyl-CoA lysocardiolipine acyltransférase
ANT : Adénosine nucleotide transférase
Apaf-1 : Apoptotic Protease Factor-1
Atg : Autophagy Related Genes
ATP : Adénosine tri-phosphate

Bak : Bcl-2 Antagonist or Killer
Bax : Bcl-2 Associated X protein
Bcl-2 : B-Cell Lymphoma 2
Bcl-xL : B-Cell Lymphoma extra-large
BCRP : Breast cancer resistance protein
Bid : BH3 Interacting Domain Death Agonist
BNIP3 : Bcl-2 adenovirus E1B 19kDa interacting protein

CCCP : Carbonyl cyanide m-chloro-phenyl hydrazone

CDP-DAG : Cytidine diphosphate-diacylglycérol

CDS : CDP-DAG synthase

CL : Cardiolipine

CLS : Cardiolipine synthase

CoQ : Coenzyme Q

CRM : Chaîne respiratoire mitochondriale

CS : Citrate synthase

CTP : Cytidine triphosphate

DHA : Acide docosahexaénoïque DRP1 : Dynamin Related Protein 1 DTNB : Acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque

EPA : Acide eicosapentaénoïque

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FADD : FAS-associated death domainFAD : Flavine adenine dinucléotideFCCP : Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

G-3-P : Glycerol-3-phosphateGDP : Guanosine diphosphate GEMGPx : Glutathion peroxidaseGSH : Glutathion

H⁺ : Protons HRP : Horse radish peroxydase Htra2/Omi : Serine protease HTRA2

IAP : Inhibitor of Apoptosis Proteins iPLA2 : Phospholipase A2 indépendante du calcium

KCN : Cyanure de potassium

Mcl-1 : Myeloid Cell Leukemia 1 Mfn : Mitofusine MLCL : Monolysocardiolipine MLCLAT : Monolysocardiolipine acyltransférase Mn-SOD : Superoxyde dismutase liée au manganèse mPTP : Pore de transition de perméabilité mitochondrial MRP : Multidrug Resistance Protein NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide NBD : Nucleotide Binding Domain

OPA : Optic Atrophy OXPHOS : Phosphorylation oxydative

PA : Acide phosphatidique
PG : Phosphatidylglycérol
PGP : Phosphatidylglycérol phosphate
PGPP : Phosphatidylglycérol phosphate phosphatase
PGPS : Phosphatidylglycérol phosphate synthase
Pi : Phosphate inorganique
Pink : PTEN-Induced Putative Kinase

Romo : Reactive Oxygen Species Modulator RT : Reverse transcription

SDS : Sodium dodecyl sulfate SIRT : Sirtuine Smac/DIABLO : Second mitochondria-derived activator of caspases SOD 1 : Superoxyde dismutase (Cuivre-Zinc)

TAZ : TafazzineTIM : Translocase Inner MembraneTMD : TransMembrane DomainTNB : TrinitrobenzèneTFP : Trifunctional proteinTOM : Translocase Outer Membrane

UCP : Uncoupling Protein

VDAC : Voltage Dependant Anionic Channel

Chapitre I : Introduction

A. La mitochondrie

a. Structure de la mitochondrie

La mitochondrie est un organite intracellulaire, présent dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (hormis les globules rouges). La structure de cet organite a été mis en évidence par les chercheurs G. Palade et F. Sjöstrand grâce à l'utilisation de la technique de microscopie électronique (Palade et al., 1953) et (Sjöstrand et al., 1953).

Cet organite, délimité par une double membrane, est composé de plusieurs compartiments Figure 1:

• Une membrane externe : perméable aux ions, aux nucléotides et aux métabolites grâce à la présence de protéines de transport : les porines

• Un espace intermembranaire

• Une membrane interne : imperméable aux ions et aux petites molécules. Elle contient de nombreuses protéines de transports permettant la perméabilité sélective de cette bicouche lipidique. Dans cette membrane se trouve les complexes protéiques nécessaires au processus d'oxydation phosphorylante. Sa surface est supérieure à celle de la membrane externe du fait de la présence de nombreux replis ou « crêtes ».

• Une matrice mitochondriale dans laquelle se trouve diverses voies métaboliques comme le cycle de Krebs et la β -oxydation. La matrice contient aussi plusieurs exemplaires de l'ADN mitochondrial.



Figure 1 : Structure de la mitochondrie. Modifiée d'après Molecular Cell Biology. W.H. Freemann and Company

i. La membrane externe mitochondriale

La membrane externe mitochondriale est composée d'une bicouche lipidique pouvant faire de 5 à 7 nm d'épaisseur. Elle est perméable à de nombreuses molécules et contient de nombreuses protéines de transport (porines) comme la protéine VDAC (Voltage Dependant Anionic Channel – 30-35 kDa) laissant passer les molécules de taille inférieure à 10 kDa (comme les acides gras, les acides aminés...) vers la matrice mitochondriale. Elle contient aussi la translocase TOM (Translocase Outer Membrane) responsable du transport de la majorité des protéines mitochondriales d'origine cytosolique et nécessitant un adressage peptidique comme par exemple le complexe II ou l'échangeur ADP/ATP (Bohnert et al., 2007). D'autres protéines, impliquées notamment dans la voie d'apoptose intrinsèque sont retrouvées dans la membrane externe. C'est le cas des protéines de la famille Bcl-2 pro-apoptotique (Bax et Bak) ou anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-_{XL}, Mcl-1) (Renault et al., 2014).

Grâce aux nouvelles techniques d'imagerie, il est désormais connu que les mitochondries ne sont pas des organites cellulaires isolés mais sont organisées en un réseau. Le réseau mitochondrial qui est associé à la maintenance mitochondriale, à la demande en énergie et à la mort cellulaire, est le résultat de la fusion et de la fission des membranes lipidiques mitochondriales. Plusieurs protéines sont impliquées dans le maintien de cette dynamique : la fission des membranes mitochondriales est réalisée par la protéine Drp1 (Dynamin Related Protein 1 – localisée dans le cytosol) tandis que la fusion est sous le contrôle des protéines OPA1 (Optic Atrophy 1 – localisée dans la membrane interne mitochondriale) et Mfn1 et 2 (Mitofusines 1 et 2 – localisées dans la membrane externe mitochondriale) (Patrushev et al., 2015).

• Composition lipidique de la membrane externe mitochondriale : Tableau 1

Cette membrane est composée à 60% de protéines et à 40% de phospholipides. La majorité des phospholipides retrouvés sont la phosphatidylcholine (~54%), la phosphatidyléthanolamine (~29%) et le phosphatidylinositol (~13%). Elle contient aussi de la phosphatidylsérine, de l'acide phosphatidique, du phosphatidylglycérol et des cardiolipines mais en faible quantité (< 1%) (Daum et al., 1997).

ii. L'espace intermembranaire

Dans cet espace, les concentrations ioniques du potassium, du calcium, du sodium et du chlore sont proches de celles retrouvées dans le cytosol. Cet espace contient aussi les protons (H⁺) expulsés au cours de la phosphorylation oxydative. Le cytochrome c est aussi présent dans

cet espace ainsi que des protéines impliquées dans l'apoptose intrinsèque comme certaines procaspases ou les protéines mitochondriales activatrices de l'apoptose Smac/DIABLO et AIF (Herrmann et al., 2010).

iii. La membrane interne mitochondriale

La membrane interne mitochondriale est imperméable sauf aux molécules neutres comme l'O₂, l'H₂O, le CO₂ et le NH₃ qui traversent par diffusion passive. De nombreux transporteurs comme l'antiport d'échange ADP cytosolique/ATP mitochondriale (ANT - Adenine Nucleotide Translocator), les symports pyruvate/H⁺, acide gras/H⁺ et phosphate inorganique/H⁺ sont retrouvés dans cette membrane. Après passage de la membrane externe via la protéine TOM, les molécules de haut poids moléculaire (comme l'ANT (Ceh-Pavia et al., 2013) ou le cytochrome c (Rehling et al., 2001) sont transportées jusqu'à la matrice mitochondriale grâce à la translocase TIM (Translocase Inner Membrane) (Bohnert et al., 2007). Au niveau des crêtes sont retrouvés les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) ainsi que l'ATP synthase responsable de la production d'énergie sous forme d'ATP via la phosphorylation oxydative.

• <u>Composition lipidique de la membrane interne mitochondriale :</u> Tableau 1

Cette membrane contient environ 80% de protéines et 20% de phospholipides. Parmi les phospholipides, on retrouve notamment la cardiolipine qui représente entre 15 à 20% des phospholipides contenus dans cette membrane (Daum el al., 1997).

Tableau 1 : Composition (%) des membranes externes et internes mitochondriales en phospholipides(d'après (Daum et al., 1997), dans le foie de rat)

	Membrane externe mitochondriale	Membrane interne mitochondriale
Phosphatidylcholine	54	40
Phosphatidylethanolamine	29	34
Phosphatidylinositol	13	5
Phosphatidylsérine	2	3
Cardiolipine	<1	18
Acide phosphatidique	1	-

iv. La matrice mitochondriale

Cet espace contient plusieurs copies du génome mitochondrial d'une taille de 16 kb contenant 37 gènes codant pour 13 protéines des sous unités des différents complexes de la

phosphorylation oxydative à l'exception du complexe II (ADN génomique), 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomique (Bellance et al., 2009). De nombreuses enzymes sont présentes et participent aux différentes voies métaboliques comme le cycle de Krebs et la β -oxydation fournissant notamment les cofacteurs nécessaires au fonctionnement de la phosphorylation oxydative.

La mitochondrie est l'organite intracellulaire permettant de fournir l'énergie, nécessaire à la cellule, sous forme d'ATP, au cours du processus de la phosphorylation oxydative. Elle est aussi impliquée dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (au niveau des complexes I et III de la CRM) ainsi que dans la mort cellulaire par apoptose (via relargage du cytochrome c vers le cytosol) ou la mitophagie (quand des dysfonctionnements mitochondriaux sont présents). Les différentes fonctions mitochondriales sont développées dans les parties suivantes.

b. La phosphorylation oxydative

L'énergie contenue dans les nutriments est transférée, après leurs passages dans les diverses voies métaboliques (β -oxydation, glycolyse, cycle de Krebs...), à deux cofacteurs réduits NADH/H⁺ et le FADH₂. Ces équivalents réduits sont oxydés au sein de la CRM par le complexe I ou le complexe II respectivement. Les électrons ainsi libérés sont transférés au coenzyme Q (ou ubiquinone – CoQ) puis du CoQ au complexe III. Ils sont ensuite pris en charge par le cytochrome c qui les transfèrent au complexe IV jusqu'à l'accepteur final d'électrons : l'oxygène qui sera réduit en H₂O. En parallèle de ce flux d'électrons, un gradient électrochimique de protons (force proton-motrice) est généré suite au pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire via les complexes I, III et IV. L'énergie de cette force est utilisée par la F0-F1 ATP synthase afin de transformer l'adénosine di-phosphate (ADP) et le phosphate inorganique (Pi) en ATP.

Les différents complexes protéiques qui composent le système de la phosphorylation oxydative sont **Figure 2** :



Figure 2 : Fonctionnement de la phosphorylation oxydative.

Le transfert des électrons des équivalents réduits (NADH+H⁺ et FADH₂) à l'oxygène moléculaire se fait par une série de réactions d'oxydo-réduction impliquant plusieurs couples redox ordonnés dans la chaîne : le complexe I (ou NADH-ubiquinone réductase) utilise le NADH+H⁺. Le complexe II (ou Succinate-ubiquinone-réductase) utilise le FADH₂. Les électrons libérés passent alors du complexe I ou II au complexe III (ubiquinone-cytochrome c-réductase) puis IV (cytochrome c oxydase) jusqu'à l'accepteur final : l'oxygène (O₂). Ce transfert est couplé à un pompage de protons (H⁺) au niveau des complexes I, III et IV depuis la matrice jusqu'à l'espace intermembranaire. Ce flux génère un gradient électrochimique de protons appelé force proton-motrice dont l'énergie est utilisée par la F0-F1 ATP synthase pour permettre la synthèse d'ATP (adénosine tri-phosphate) à partir de l'adénosine di-phosphate (ADP) et du phosphate inorganique (Pi).

• Le complexe I ou NADH-ubiquinone oxydoréductase :

Ce complexe est le premier de la CRM et est situé dans la membrane interne. Il est composé de 45 sous-unités. Ce complexe permet le transfert de deux électrons apportés par le NADH (suite à la dégradation du pyruvate au sein du cycle de Krebs ou provenant de la β -oxydation après oxydation des hydroxyacyl-CoA par le NAD⁺) au CoQ présent dans la membrane interne. Ce transfert d'électrons se fait en parallèle d'un pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire.

• Le complexe II ou Succinate-ubiquinone-oxydoréductase :

Il est situé sur la face interne de la membrane interne mitochondriale. Il est composé d'un hétéro-dimère soluble possédant une activité catalytique « succinate déshydrogénase » et d'une sous-unité membranaire possédant une activité succinate-CoQ oxydoréductase nécessaire au transport des électrons. Ce complexe intervient dans deux voies métaboliques : le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. Il catalyse le transfert de deux électrons du FADH₂ au COQH₂. Ce transfert s'effectue après oxydation du succinate en fumarate lors du

cycle de Krebs ou suite à la déshydrogénation des acyl-CoA par le FAD au cours de la β -oxydation et n'est pas couplé avec un pompage de protons vers l'espace intermembranaire.

bc1:

• <u>Le complexe III ou ubiquinone-cytochrome c-réductase ou cytochrome</u>

Il est constitué d'un dimère dont chacune des parties contient 12 sous-unités. Il catalyse le transfert des électrons provenant du pool de CoQH₂ au cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire. Ce transfert d'électrons est couplé à un pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire grâce au cycle Q **Figure 3**. Le cycle Q est réalisé au niveau du cytochrome b dans deux sites réactionnels localisés de manière opposée dans la membrane : le site Q0 (localisé sur la face positive), permettant l'oxydation de CoQH₂ en CoQ et le site Qi (localisé sur la face négative), permettant la réduction du CoQ formé en CoQH₂ (Bleier et al., 2013).

Dans un premier temps, une molécule de CoQH₂ va être oxydée en CoQ via la formation d'un anion semiquinone instable (Q⁻) au niveau d'un site appelé Q0. Cette oxydation s'accompagne d'un transfert d'électrons au cytochrome c par la protéine Rieske Fer-Soufre et d'un pompage de deux protons vers l'espace intermembranaire. Une partie des électrons est transférée au site Qi où le CoQ formé sera réduit pour permettre la formation d'une nouvelle molécule de CoQH₂. Le nouveau CoQH₂ formé, peut à son tour subir un nouveau cycle d'oxydation au niveau de ce complexe **Figure 3**. Au final, l'oxydation des molécules de CoQH₂ au niveau du complexe II par le cycle Q permet le pompage de protons dans l'espace intermembranaire et le transfert d'électrons au cytochrome c (Lenaz et al., 2010).



Figure 3 : Le cycle Q au niveau du complexe III de la phosphorylation oxydative.

Une molécule de $CoQH_2$ est oxydée au niveau du site Q0 en CoQ. Une partie des électrons est transmis au cytochrome c via la protéine Rieske. Ceci se fait en parallèle d'un pompage de deux protons vers l'espace intermembranaire. La partie restante des électrons est transmise au site Qi pour permettre la réduction du CoQ formé en CoQH₂. Cyto = cytochrome.

• Le complexe IV ou cytochrome c oxydase :

Ce complexe est constitué d'un dimère comprenant 8 sous unités chacun et catalyse la réaction finale des réactions d'oxydo-réductions de la phosphorylation oxydative. Les électrons apportés par le cytochrome c sont transférés à l'accepteur final : l'oxygène qui sera ensuite réduit en H₂O. Ce transfert d'électrons est associé à un pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire.

• <u>La F0-F1 ATP synthase</u> :

Ce complexe est composé de deux parties et utilise l'énergie apportée par les H⁺ contenus dans l'espace intermembranaire pour synthétiser l'ATP à partir de l'ADP et du Pi. Le segment transmembranaire F0 (ou stator) forme un canal conduisant les H⁺ vers la matrice mitochondriale. Le segment contenu dans la matrice F1 (ou rotor) est composé de 5 sous-unités (α , β , γ , ε et δ) et forme la partie catalytique de ce complexe. Les sous-unités α possèdent un site de liaison pour l'ADP et le Pi ; les sous-unités α et β forment l'hélice associée au segment F0. Le passage des H⁺ via le segment F0 entraine une rotation du complexe α/β permettant la synthèse d'ATP via la liaison entre l'ADP et le Pi.

• Efficacité de la phosphorylation oxydative :

La théorie chimio-osmotique de Peter Mitchell explique un couplage entre la consommation d'oxygène mitochondriale et la phosphorylation de l'ADP en ATP (Mitchell, 1961). L'oxydation des différents substrats, au sein des différents complexes de la CRM, entraîne un transfert d'électrons associé à un pompage de protons vers l'espace intermembranaire formant ainsi un gradient électrochimique. Ceci crée une force protonmotrice (Δp) caractérisée par : une différence de pH (gradient de pH ou Δp H) entre la matrice (pH alcalin, pH environ 7.8) et l'espace intermembranaire (pH acide, pH = 6,88 ± 0,09) (Porcelli et al., 2005) et une différence de potentiel de membrane ($\Delta \Psi$ m) résultat de l'accumulation des protons dans l'espace intermembranaire. Cette accumulation de protons dans l'espace intermembranaire. Cette accumulation de protons dans l'espace intermembranaire de phosphoryler l'ADP en ATP (Mitchell, 1961).

Ce couplage (consommation d'oxygène et synthèse d'ATP) détermine l'efficacité de la synthèse d'ATP mitochondriale (ou rendement de conversion énergétique). Ce couplage n'est pas parfait et une partie de l'oxygène n'est pas utilisée pour la synthèse d'ATP mais est perdue sous forme de chaleur (ou gaspillage énergétique). Les phénomènes à l'origine de ce gaspillage

- 29 -

énergétique peuvent être : une modification du pompage des protons (découplage intrinsèque) ou une modification de la force proton-motrice (découplage extrinsèque) **Figure 4**.

• Le <u>découplage intrinsèque</u> (*slipping*) se localise au sein des complexes de la phosphorylation oxydative capables d'un transfert de protons (complexe I, III et IV ainsi que l'ATP synthase). Ce phénomène entraine une modification du rapport H⁺/e⁻ (*redox slipping*) ou du rapport H⁺/ATP (*proton slipping*). Le *redox slipping* est caractérisé par un transfert des électrons entre les complexes non associés à un pompage de protons vers l'espace intermembranaire. Le *proton slipping* est caractérisé par un retour des protons dans la matrice mitochondriale via le passage de l'ATP synthase mais non associé à la production d'ATP **Figure 4** (Kadenbach, 2003).

• Le <u>découplage extrinsèque</u> (*proton leak*) se caractérise par une fuite de protons de manière passive ou active (via UCP1 et ANT) vers la matrice mitochondriale. Le retour des protons s'effectue de manière indépendante de son utilisation par l'ATP synthase. Ce phénomène est associé à une augmentation de la perméabilité membranaire **Figure 4**. On distingue deux types de fuites de protons : la fuite de protons basale et la fuite de protons inductible.

Le mécanisme à l'origine de la <u>fuite de protons basale</u> n'est pas clairement compris mais il semble que la composition en acides gras ou la quantité des phospholipides de la membrane interne mitochondriale soient impliquée. En effet, une diminution de la fuite de protons basale est corrélée avec une diminution de la quantité d'acides gras polyinsaturés contenue dans les phospholipides membranaires et une augmentation à la teneur en acides gras monoinsaturés (Brand et al., 2003).

Cette fuite peut aussi être attribuée à la quantité d'ANT présente (en dehors de sa fonction d'échangeur ADP/ATP) (Divakaruni et al., 2011) et (Brand et al., 2005).

Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans la fuite de protons inductible :

- La protéine UCP1 (Uncoupling Protein 1) retrouvée dans le tissu adipeux brun participe fortement à cette fuite de proton inductible. Cette protéine peut être activée par les acides gras libres ou des espèces activées de l'oxygène comme l'anion superoxyde. Son rôle principal est connu lors du processus de thermogénèse après découplage de la phosphorylation oxydative (Kadenbach, 2003). Des isoformes d'UCP1 comme les protéines UCP2 (protéine ubiquitaire) et UCP3 (retrouvée dans le muscle squelettique) pourraient aussi participer à la fuite de protons dans d'autres tissus mais ceci est encore très discuté (Divakaruni et al., 2011). En effet, la fuite de protons attribuable à l'UCP2 n'est pas observée dans des mitochondries issues de tissus exprimant cette protéine (Cannon et al., 2006). Plusieurs explications peuvent être données à cette observation : (1) la protéine UCP2 est exprimée de manière si faible que son activité en tant que protéine découplante ne peut être détectable, ou (2) cette protéine a besoin d'un facteur d'activation *in vitro* afin de déclencher son activité de découplage (Cannon et al., 2006). L'implication de la protéine UCP2 d'en d'autres fonctions cellulaires a été rapportées, mais ne sera pas discuté ici (Bouillaud et al., 2016) et (Nedergaard et al., 2003).

- Les acides gras libres sont généralement considérés comme découpleurs du processus de phosphorylation oxydative. En effet, l'ajout de faibles concentrations d'acides gras libres à longues chaînes (acide palmitique 16:0) entraine un découplage respiratoire caractérisé par une baisse du potentiel de membrane ainsi qu'une diminution de l'efficacité de synthèse d'ATP (diminution du rapport ATP/O). Ce découplage (augmentation du retour des protons dans la matrice mitochondriale) peut être due à un transfert spontané des acides gras protonés du feuillet externe au feuillet interne de la membrane interne mitochondriale par un mécanisme « flip-flop », ou à un transfert de ces molécules via la participation de l'ANT ou des UCP (Wojtczak et al., 1999) et (Di Paola et al., 2006). Les acides gras peuvent aussi être transportés à travers la membrane interne mitochondriale par l'ANT (Bernardi et al., 2002). Ce mécanisme a été mis en évidence par l'utilisation de carboxyatractyloside (inhibiteur de l'ANT). Cette molécule entraine une réduction partielle de la fuite de protons induite par les acides gras comme le palmitate (Wojtczak et al., 1999). En résumé, les acides gras peuvent conduire à une fuite de protons inductible par un mécanisme de « flip-flop » ou via leur passage dans l'ANT ou les UCP.

- Les ERO pourraient aussi participer à cette fuite. Un premier lien entre les UCP et les ERO a été suggéré après avoir observé que l'utilisation du GDP (inhibiteur de l'UCP1) entrainait d'une part une augmentation de potentiel de membrane mais aussi une augmentation de la production d'H₂O₂ dans les mitochondries (Negre-Salvayre et al., 1997). Le 4-HNE (produit de la peroxydation lipidique) semble aussi pouvoir induire un découplage des mitochondries par les UCP mais aussi par l'ANT (Brand et al., 2004). En résumé, les ERO ou les produits de la peroxydation lipidique (4-HNE) peuvent provoquer un découplage des mitochondries via l'augmentation du passage de protons par les UCP ou l'ANT.





Source : Thèse Julienne Cloé Mimsy (année 2012 - Université François-Rabelais, TOURS)

1 – Fonctionnement normal de la phosphorylation oxydative.

2 - Découplage intrinsèque ou « redox slipping » : modifications du rapport H⁺/e⁻. Moins de protons sont pompés pendant le transfert des électrons à travers les complexes respiratoires.

3 - Découplage intrinsèque ou « proton slipping » : modifications du rapport H⁺/ATP. La synthèse d'ATP nécessite un pompage plus important de protons au travers de l'ATP synthase.

4 - Découplage extrinsèque ou « proton leak » : retour direct des protons dans la matrice mitochondriale à travers la membrane interne sans passage par l'ATP synthase. Le retour des H⁺ n'est pas associé à une synthèse d'ATP.

Ces différents processus de découplage conduisent à une diminution de la force protonmotrice et induisent une diminution de la synthèse d'ATP mitochondriale. Ce découplage peut être mimé via l'utilisation de molécules chimiques protonophores comme le carbonyl cyanide m-chloro-phenyl hydrazone (CCCP) ou le p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazone (FCCP). Ces molécules sont à l'origine d'une translocation des protons à travers les bicouches lipidiques entrainant ainsi une diminution du gradient de protons contenu dans l'espace intermembranaire.

• Organisations des complexes de la phosphorylation oxydative mitochondriale :

La mitochondrie étant un organite « dynamique », l'assemblage de ses différents complexes respiratoires peut subir une réorganisation afin d'optimiser sa production d'ATP. Différents modèles de l'organisation des complexes de la phosphorylation oxydative ont été proposés : un modèle dit « solide » ou « supercomplexe », un modèle dit « fluide » et un modèle dit « dynamique » (Acin-Perez et al., 2008).

Dans le <u>modèle « solide » ou « supercomplexes »</u>, les complexes sont maintenus à de faible distance les uns des autres afin de ne former qu'un seul bloc. Ce modèle permet un meilleur passage des électrons entre les complexes. Les nouvelles techniques de purification (BN-Page) ont pu mettre en évidence qu'il était possible de purifier des superstructures contenant des assemblages stables de complexes respiratoires. Le terme de modèle « solide » a dans un premier temps été attribué puis a évolué en « supercomplexes » **Figure 5** (Schägger et al., 2000). Cette technique a permis de mettre en évidence l'existence de deux supercomplexes composés comme suit : I_1 +III₂+IV₀₋₄ (un complexe I + deux complexes III et entre 0 et 4 complexes IV) et III₂+IV₄ (deux complexes III et quatre complexes IV) (Acin-Perez et al., 2008) et (Schägger et al., 2000).

Dans le <u>modèle « fluide »</u> ou modèle de « collision aléatoire », les différents complexes de la phosphorylation oxydative forment des entités distinctes et les cofacteurs, CoQ et cytochrome c, sont libres de diffuser à travers la membrane interne mitochondriale et l'espace intermembranaire respectivement afin de permettre au flux d'électrons de se propager **Figure 5** (Hackenbrock et al., 1986).

Le dernier modèle à avoir été décrit est le <u>modèle « dynamique »</u>. Il se compose à la fois de « supercomplexes » mais aussi d'entités distinctes de complexes (complexes isolés) comme dans le modèle « fluide ». Ce modèle semble être le plus proche de la réalité, montrant ainsi la cinétique et la dynamique de réorganisation des complexes de la phosphorylation oxydative (Acin-Perez et al., 2014).



Figure 5 : Modèle d'assemblage des complexes de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Source : (Acin-Perez et al., 2014)

Modèle « fluide » : les différents complexes de la phosphorylation oxydative sont indépendants, permettant une libre diffusion des cofacteurs. Modèle « solide » ou « supercomplexes » : les différents complexes sont réunis en un seul bloc formant une entité unique.

Les recherches actuelles ont essayé de mettre en évidence un rôle propre à l'organisation des complexes de la phosphorylation oxydative sous forme de « supercomplexes », sans pour autant donner de conclusion définitive. Ces études mettent en évidence :

<u>Une augmentation de l'efficacité du transport d'électrons</u> : L'assemblage des complexes respiratoires sous forme de « supercomplexes » permettrait d'améliorer l'efficacité du transfert d'électrons par la canalisation des substrats ou en augmentant leur catalyse et ainsi permettre une meilleure synthèse d'ATP (Blanchi et al., 2004). L'absence de certains complexes mitochondriaux comme le complexe III, le complexe IV ou le cytochrome c entrainerait un désassemblage des « supercomplexes » et par conséquent une diminution de l'efficacité de transfert des électrons et donc de la synthèse d'ATP mitochondriale (Acin-Perez et al., 2014)

<u>Une limitation de la production d'ERO par le complexe I</u> : L'accélération du transport des électrons au sein de ces « supercomplexes » s'accompagnerait d'une diminution de la production d'ERO.

Dans un modèle de mitochondrie hépatique, la faible interaction entre les complexes I et III (perturbation de l'assemblage des « supercomplexes ») entraine une augmentation de la production d'ERO (Maranzana et al., 2013). Le stress oxydatif engendré par la production d'ERO entraine des dommages lipidiques notamment au niveau des CL qui à leur tour se répercutent sur le maintien de la structure des « supercomplexes » **Figure 6** (Schägger et al., 2000).



Figure 6 : Répercutions de la perte de l'assemblage des « supercomplexes » sur la mitochondrie. Modifié d'après (Lenaz et al., 2010)

La perturbation de l'organisation des « supercomplexes » entraine (1) une désorganisation du complexe I et (2) une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP. Ces deux phénomènes engendrent un stress oxydatif pouvant altérer la structure des phospholipides mitochondriaux (peroxydation lipidique) qui a son tour peut conduire à une perturbation des « supercomplexes ».

Ainsi, l'organisation des complexes respiratoires en « supercomplexes » permet une facilitation du transport des électrons à travers les complexes respiratoires mitochondriaux lors du processus de phosphorylation oxydative. Ce meilleur transfert conduit à un meilleur fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et par conséquent à une meilleure synthèse d'ATP.

c. La production d'ERO mitochondriale

Les ERO sont des molécules chimiques oxygénées pouvant entrainer l'oxydation d'autres molécules. Parmi les ERO, on retrouve en majorité l'anion superoxyde (O_2 .), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH) et les radicaux peroxydes (RCOO et ROO).

La production d'ERO peut se faire lors de la phosphorylation oxydative au cours de laquelle des électrons de la CRM interagissent directement avec des molécules d'O₂. Ceci conduit à la formation de l'anion superoxyde qui est pris en charge par la superoxyde dismutase liée au manganèse (Mn-SOD ou SOD2), contenue dans la matrice mitochondriale (Karnati et al., 2013). Cette enzyme permet la formation à partir de l'anion superoxyde, de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène selon la réaction suivante: $2 O_2^{-1} + 2 H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$

- 35 -

L'anion superoxyde peut aussi être pris en charge par la superoxyde dismutase (SOD1) situé dans l'espace intermembranaire. La présence de cette enzyme est cependant très faible dans la mitochondrie en comparaison du cytosol où elle est principalement retrouvée (Okado-Matsumoto et al., 2001).

La formation d'H₂O₂ peut, en présence de fer, induire la production de radicaux hydroxyle (OH·) par la réaction de Fenton, entrainant ainsi des dommages de l'ADN, une oxydation protéique et une peroxydation lipidique. Il est donc important que l'H₂O₂ soit dégradée pour empêcher la formation de dommages biologiques. Cette dégradation s'effectue grâce à des enzymes antioxydantes comme la glutathion peroxydase 4 (GPx4) au niveau mitochondrial. Cette enzyme permet la formation de molécule d'eau et de gluthation disulfite selon la réaction suivante: $2 \text{ GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{ GSSG} + \text{H}_2\text{O}$

La mitochondrie est actuellement considérée comme une source non négligeable d'ERO cellulaire mais est aussi une cible privilégiée de ces radicaux. Environ 1 à 5% de l'oxygène consommé par la mitochondrie sera transformé en ERO. Au sein de la CRM, deux sites de production d'ERO ont été mis en évidence : le complexe I et le complexe III (Kussmaul et al., 2006) et (Grivennikova et al., 2006).

• <u>Production d'ERO via le complexe I :</u> Figure 7

Le premier mécanisme de production d'ERO par le complexe I est réalisé lors d'une forte accumulation de protons dans l'espace intermembranaire (condition de gaspillage énergétique). Les protons accumulés dans cet espace conduisent à une augmentation du pool de CoQH₂ réduit. Dans ces conditions, les électrons du CoQH₂ sont retransmis au complexe I (car le complexe III est saturé) par un flux inverse des électrons. Ce flux inverse entraine une réduction du NAD⁺ en NADH au niveau des groupements FMN du complexe I et la formation d'anion superoxyde (Murphy, 2009).

Cette production peut être mise en évidence via l'utilisation de succinate (substrat du complexe II) et de roténone (inhibiteur spécifique du site Q présent dans le complexe I) (Lambert et al., 2009).

Lorsque l'intensité de consommation d'oxygène est peu élevée, la mitochondrie produit une faible quantité d'ATP (donc un faible taux de protons dans l'espace intermembranaire), ceci conduit à une augmentation du ratio NADH/NAD⁺ au niveau du complexe I. Cette augmentation du ratio entraine une réduction des groupements FMN qui peuvent alors réagir avec l'oxygène et former l'anion superoxyde (Murphy, 2009).



Figure 7 : Mécanismes de production d'ERO par le complexe I mitochondrial.

Mode 1 : En condition de gaspillage énergétique en présence d'une force proton-motrice élevée, la quantité de CoQ est augmentée. Le complexe III mitochondrial ne pouvant pas oxyder le CoQ, les électrons de celui-ci sont transmis au complexe I ou ils provoquent la réduction du NAD⁺ au niveau des groupements FMN et permettent la production d'ERO.

Mode 2 : En condition de production faible d'ATP où la consommation d'oxygène est faible, le rapport NADH/NAD⁺ est augmenté, entrainant une augmentation de la réduction des groupements FMN du complexe I et la formation d'ERO.

La formation d'ERO par la complexe I conduit à la formation d'anion superoxyde du côté de la matrice mitochondriale (Brand et al., 2004). Cet anion sera éliminé dans la matrice grâce à la Mn-SOD.

Le complexe I peut aussi participer à la production d'ERO suite à la réduction de molécules thérapeutiques génératrices d'ERO comme les anthracyclines et notamment la doxorubicine. Ce mécanisme est développé dans le chapitre I - partie C.

• <u>Production d'ERO via le complexe III :</u>

La production d'ERO au sein du complexe III dépend du transfert d'électrons entre le CoQH₂ et le cytochrome c via le cycle Q. L'utilisation de mixothiazol (inhibiteur du site Q0) prévient la formation d'ERO par le complexe III. En revanche, l'antimycine A (inhibiteur du transfert d'électrons entre les sites Q0 et Q1), conduit à une augmentation de la production d'ERO par le complexe III suite à une accumulation de la forme semiquinone au niveau du site Q0 (Kowaltowski et al., 2009) et (Lenaz et al., 2010). Lors de l'oxydation du succinate en présence de roténone (inhibition du complexe I et donc du flux inverse d'électrons), le taux de production d'ERO est relativement faible suggérant que la production par le complexe III est négligeable par rapport à celle du complexe I (Murphy, 2009). La formation d'ERO par le
complexe III conduit à la libération d'anion superoxyde de chaque côtés de la membrane interne mitochondriale (Muller et al., 2004). L'anion superoxyde formé du côté matricielle sera pris en charge par la Mn-SOD tandis que celui formé au niveau de l'espace intermembranaire sera être pris en charge par la SOD1.

La production d'ERO par la mitochondrie quand elle est trop élevée peut conduire à l'augmentation de la peroxydation lipidique des CL (Chapitre I – partie B), à des dysfonctionnements des complexes de la phosphorylation oxydative. Mais à de faibles concentrations, ces molécules sont considérées comme seconds messagers (voie de signalisation impliquées dans la prolifération, la croissance et la survie cellulaire). Dans une cellule cancéreuse, les ERO participeraient au processus de tumorigenèse (prolifération cellulaire, métabolisme ou encore angiogenèse) (Sullivan e al., 2014). En revanche, une production plus élevée conduit à des dommages tels que la peroxydation lipidique (altérations des membranes), l'oxydation de l'ADN et des protéines (Ott et al., 2007).

d. La mort cellulaire

i. L'apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire programmée caractérisée par une fragmentation nucléaire, une condensation de la chromatine et l'apparition de « bourgeons » au niveau de la membrane plasmique. Elle peut être activée par deux voies distinctes : la voie « extrinsèque » et la voie « intrinsèque » (ou mitochondriale) qui peuvent s'interconnecter :

• La <u>voie extrinsèque</u> Figure 8 (qui ne sera pas développée ici) (ou voie du récepteur de mort) s'effectue via la fixation de molécules à des récepteurs appartenant à la famille des TNF α (Tumor Necrosis Factor) ou au récepteur Fas/FasL. Ces deux récepteurs possèdent du côté intracellulaire, un domaine de mort permettant le recrutement d'une protéine adaptatrice FADD (FAS-associated death domain). Cette protéine active les caspases 8 et 10 (caspases initiatrices) qui à leur tour vont activer les caspases 3 et 7 (caspases effectrices) (Green et al., 2002). L'activation des caspases se fait suite à un clivage après leur résidu aspartate et conduit à la formation de la forme active de cette enzyme (Tait et al., 2010).

• La <u>voie intrinsèque</u> Figure 8 est activée en réponse à différents signaux intracellulaires (dommage à l'ADN, UV, stress hypoxique ou stimulus oncogéniques) et

entraine la libération de diverses protéines mitochondriales pro-apoptotiques comme le cytochrome c après la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale.

Deux voies permettent la libération des protéines mitochondriales pro-apoptotiques :

En réponse aux signaux pro-apoptotiques, l'activation des protéines pro-apoptotiques Bax (Bcl-2 Associated X protein) et Bak (Bcl-2 Antagonist or Killer) conduit à leur oligomérisation puis à leur insertion dans la membrane externe mitochondriale. L'insertion de ce complexe au niveau de cette membrane entraine sa perméabilisation suite à la formation d'un pore (Renault et al., 2014). Ce processus conduit à un relargage du cytochrome c et des autres protéines mitochondriales pro-apoptotiques (exemple : Smac/DIABLO, Htr2/Omi). Les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2) ou Bcl-_{XL} (B-Cell Lymphoma extra-large) ou Mcl-1 (Myeloid Cell Leukemia 1) peuvent inhiber ce processus.

Le relargage du cytochrome c peut aussi se faire au travers du mPTP (Pore de Transition de Perméabilité mitochondriale). Ce pore est un complexe multiprotéique dont les différents constituants ne sont à l'heure actuelle pas tous connus. L'ANT, la cyclophiline-D, la porine VDAC et également des dimères de l'ATP synthase semblent participer à la formation de ce complexe (Bernardi, 2013) et (Rasola et al. 2014). L'ouverture de ce pore entraine une chute du potentiel de membrane mitochondrial conduisant à un découplage de la phosphorylation oxydative. Cette ouverture peut aussi entrainer un gonflement mitochondrial (« swelling ») entrainant la rupture de la membrane externe mitochondriale. Ces différents mécanismes conduisent à la mort cellulaire.

Les différents régulateurs du mPTP sont bien étudiés. L'ouverture du mPTP est très sensible aux stimulis induit par le calcium (Hurst et al., 2016), mais aussi à l'augmentation du pH matriciel ou encore aux protéines pro-apoptotiques Bax et Bak ou suite à la peroxydation lipidique (notamment de la CL). A l'inverse une inhibition de l'ouverture du mPTP peut être opérée par des ligands de la cyclophiline-D comme la cyclosporine A ou les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-_{XL} (Kroemer et al., 2007). Le complexe I semble aussi être impliqué dans la régulation de l'ouverture de ce pore. L'utilisation de substrat respiratoire spécifique du complexe I entraine une ouverture plus précoce du mPTP (Bernardi, 2013). L'utilisation de roténone ou la sérine protéase SERPINB3, entrainent une inhibition de l'ouverture du mPTP suite à l'inhibition du complexe I (Bernardi, 2013), (Ciscato et al., 2014).

Une fois dans le cytosol, le cytochrome c libéré va se lier à la protéine Apaf-1 (Apoptotic Protease Factor 1) en présence d'ATP. Cette association conduit au recrutement de la procaspase 9 pour former l'apoptosome (complexe multiprotéique). Ce complexe va permettre l'activation de la caspase 9 qui a son tour va pouvoir activer les caspases 3 et 7 (Borner, 2003). La libération dans le cytosol d'autres protéines mitochondriales comme les protéines Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activotor of caspases) et Htra2/Omi va activer les caspases 3 et 7 via leur fixation sur les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (Tait et al., 2010).

Une relation est possible entre ces deux voies apoptotiques, via la protéine Bid (BH3 Interacting Domain Death Agonist). Celle-ci est recrutée par les caspases initiatrices de la voie extrinsèque pour permettre une amplification du signal apoptotique. La protéine Bid est clivée en protéine tBid par la caspase 8 et va permettre l'oligomérisation des proteines pro-apoptotiques Bax et Bak (activateur direct), conduisant au relargage du cytochrome c et à la mort cellulaire via le processus décrit précédemment **Figure 8**



Figure 8 : Mécanismes d'interconnections entre la voie extrinsèque et la voie intrinsèque de la mort par apoptose.

Source : (Tait et al., 2010)

Voie intrinsèque de l'apoptose : a) L'activation de la voie mitochondriale peut être réalisée par la protéine tBid ou suite à un stress cellulaire. Ces processus vont conduire au recrutement des protéines Bad et Bax au niveau de la membrane externe mitochondriale. Cette fixation va entrainer le relargage du cytochrome c ainsi que d'autres protéines pro-aopototiques dans le cytosol suite à la perméabilisation de la membrane externe. Le cytochrome c va alors former complexe multiprotéique un (l'apoptosome) entrainant l'activation des caspases effectrices (3 et 7).

b) Voie extrinsèque de l'apoptose : La fixation des ligands aux récepteurs TNF ou Fas entraine le recrutement de l'adaptateur FADD au niveau de leur domaine de mort. Le recrutement des caspases initiatrices (caspase 8 et 10) via ce domaine va conduire à l'activation des caspase effectrices (3 et 7).

ii. L'autopagie et la mitophagie

Cette partie reprend les principaux points abordés dans les revues suivantes : « Autophagy regulation in the development and treatment of breast cancer » (Zhou et al., 2015), « Mitophagy an cancer » (Chourasia et al., 2015) et « Mitochondria an Mitophagy : The Yin and Yang of cell death control » (Kubli et al., 2012).

L'**autophagie** est un processus complexe qui permet aux cellules une digestion de différents éléments dysfonctionnels (comme les ribosomes, l'appareil de Golgi ou le noyau).

Ce mécanisme est réalisé en présence d'énergie et est caractérisé par la formation d'un autophagosome (à l'aide des membranes des organites périphériques) puis par une fusion entre l'autophagosome et les lysosomes permettant une dégradation du contenu par action des enzymes lysosomiales. L'autophagie est régulée par plus de 30 gènes appelés Atg (Autophagy Related Genes) et se réalise en quatre étapes **Figure 9** :

- Initiation et formation de la membrane autophagique : le phagophore
- Formation de l'autophagosome permettant une séquestration sélective des éléments cellulaires
- Formation de l'autolysosome : fusion de l'autophagosome avec le lysosome
- Dégradation du contenu et le recyclage de la vacuole autophagique



Figure 9 : Principales étapes du processus de l'autophagie. Source : modifié d'après (Zhou et al., 2015)

La formation et l'élongation de l'autophagosome s'effectue grâce aux membranes provenant des organites situés en périphérie et grâce à deux complexes de conjugaison : le complexe formé par l'Atg12-Atg15-Atg16 et le complexe LC3-II (formé suite au clivage de la protéine LC3 par l'Atg4 pour former la LC3-I, et à la liaison de LC3-I à la phosphatidyléthanolamine). La composition des membranes autophagiques n'est pas clairement définie mais peut inclure des membranes provenant de diverses sources cellulaires comme le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique, l'appareil de Golgi, les endosomes. Les membranes associées aux mitochondries ont également été identifiées comme site de formation de l'autophagosome chez les mammifères.

Le taux de phosphatidyléthanolamine contenu dans la mitochondrie semble jouer un rôle dans la formation de l'autophagosome. En effet, une réduction de ce taux entraine une diminution de l'autophagie. De manière inverse, une augmentation de l'autophagie est possible suite à l'ajout exogène de ce lipide (Hsu et al., 2016). D'autre part, il semble que l'augmentation

du taux de phosphatidylglycérol conduise à une augmentation de ce processus de mort cellulaire (Hsu et al., 2016). Les cardiolipines semblent aussi être impliqué dans ce processus (Chapitre I - partie B).

La **mitophagie** est un processus cellulaire « autophagique » spécifique de l'élimination des mitochondries. C'est un moyen qui permet aux cellules de répondre à la fois aux variations environnementales et nutritives comme l'hypoxie ou la privation de nutriments mais aussi d'éliminer les mitochondries dysfonctionnelles. Deux voies cellulaires permettent la mitophagie chez les mammifères :

• <u>Régulation de la mitophagie par le couple PINK-1/Parkin :</u> Figure 10

La protéine Parkin est une E3 ubiquitine ligase et est codée par le gène *PARK2* porté sur le chromosome 6. Cette protéine est située majoritairement dans le cytosol en condition normale mais est transloquée à la mitochondrie, de manière rapide, suite à une dépolarisation membranaire mitochondriale. Le recrutement de cette protéine se fait au niveau de la membrane externe mitochondriale suite à sa phosphorylation par la protéine PINK-1 (PTEN-Induced Putative Kinase 1). Plusieurs protéines mitochondriales ont été identifiées comme protéines d'ancrage de Parkin comme la Rho GTPase Miro (rôle dans la connexion entre mitochondries et microtubules), les protéines de fusion Mfn1/2 ou encore la porine VDAC. Une fois les différentes protéines mitochondriales ubiquitinylées par Parkin, celle-ci vont servir de site d'ancrage à la protéine p62/SQSTM1 permettant ainsi de réaliser une liaison entre la mitochondrie et la protéine LC3 (phagophore). Ce recrutement mitochondrial peut-être inhibé par des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-_{XL} et Bcl-2 et activé par des protéines pro-



Figure 10 : Recrutement de la protéine Parkin et régulation de la mitophagie par PINK-1/Parkin après dépolarisation du potentiel de membrane mitochondriale.

Source : (Chourasia et al., 2015)

Dans un contexte physiologique où la mitochondrie est polarisée, la protéine PINK-1 est dégradée dans la matrice mitochondriale. Lors d'une dépolarisation membranaire, la protéine PINK-1 s'accumule dans la membrane externe et permet le recrutement de Parkin. Une fois la protéine Parkin recrutée, celle-ci permet l'ubiquitynilisation des protéines VDAC, Mfn-2 ou Miro (substrate X). L'ubiquitinylasation de ces protéines favorise l'interaction avec la protéine pC2/SQSTM1 qui permet l'interaction avec la protéine LC3 présente sur le phagophore naissant.

• <u>Régulation par des récepteurs de l'autophagie : BNIP3 et Nix :</u> Figure 11

Cette dégradation de la mitochondrie se fait de manière indépendante de la voie PINK-1/Parkin et fait intervenir des récepteurs de l'autophagie (BNIP3 et Nix) au niveau mitochondrial. Les protéines BNIP3 (Bcl-2 adenovirus E1B 19kDa interacting protein) et Nix sont situées dans la membrane externe mitochondriale et font parties des protéines proapoptotique de la famille Bcl-2 ne possédant qu'un seul domaine BH3. Une diminution du potentiel mitochondrial entraine la formation du complexe BNIP3/Nix (ou BNIP3L) sous forme d'homodimère et le recrutement de manière directe de la protéine LC3 située sur le phagophore. Cette interaction avec LC3 peut être modulée par les protéines Bcl-2 ou Bcl-_{XL} (Chourasia et al., 2015).



Figure 11 : Régulation de la mitophagie par des récepteurs autophagiques mitochondriaux. Source : (Kubli et al., 2012)

Le processus de mitophagie via les récepteurs BNIP3 et Nix se fait par un recrutement direct de la protéine LC3 situé sur le phagophore.

La dégradation de la mitochondrie se fait ensuite de la même manière pour les deux voies d'initiation de la mitophagie c'est-à-dire via la formation de l'autophagosome, suivi de la fusion avec le lysosome et enfin par sa dégradation par les enzymes lysosomiales.

Au final, la mitochondrie peut participer aux différents types de mort cellulaire via un point commun qui est la perte du potentiel de membrane mitochondrial. Ainsi lorsque seulement quelques mitochondries présentent une perte de leur potentiel membranaire, c'est le processus de mitophagie que sera choisi par la cellule afin de dégrader les mitochondries dysfonctionnelles et de maintenir la fonctionnalité des autres. En revanche, quand un nombre plus important de mitochondries présentent une diminution du potentiel de membrane alors l'apoptose intrinsèque prendra le relais de la mitophagie devenue insuffisante pour contenir les facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux et la libération du cytochrome c vers le cytosol (Kubli et al., 2012).

B. Les cardiolipines

Les cardiolipines (CL) ou diphosphatidylglycérol ou 1,3-bis(*sn*-3'-phosphatidyl)-*sn*glycérol ont été isolées pour la première fois en 1942, à partir de cœur de bœuf par Mary Pangborn (Pangborn, 1942). Ce phospholipide est composé de trois groupements glycérols, de deux groupements phosphates et de quatre chaînes latérales d'acides gras. La présence de ces acides gras donne à la CL une structure bien spécifique, en forme de cône, permettant la formation de courbures membranaires dans la membrane interne mitochondriale (Schlame et al., 2000). Ce phospholipide, retrouvé en majorité au niveau de la membrane interne mitochondriale, est considéré comme la signature lipidique de la mitochondrie.

a. Structure des cardiolipines

Sa structure a été établie par LeCocq et Ballou en 1964 (LeCocq et al., 1964). Ce phospholipide présente une structure atypique : un groupement glycérol (tête) estérifié par deux groupements phosphatidylglycérol (corps) **Figure 12**.



Figure 12 : Structure de la cardiolipine. Modifié d'après « AOCS lipid library »

Malgré une symétrie de structure apparente, les CL possèdent deux groupements phosphatidyls distincts (la composition des chaînes latérales pouvant être différente). Cette configuration donne à la molécule deux centres chiraux : l'un en pro-R et l'autre en pro-S. Grâce à cette configuration unique, la CL est capable de former des structures particulières : micelles

(ou bicouches). La tête glycérol, située entre les deux acides phosphatidiques, entraine une mobilité restreinte de cette molécule réduisant sa capacité à former des interactions intra- ou intermoléculaires avec d'autres phospholipides (Schlame et al., 2000).

La présence des quatre chaînes latérales d'acides gras permet de nombreuses combinaisons de composition : une variation pour un même tissu en fonction des espèces ou une variation de composition en fonction des tissus pour la même espèce. Les données montrent que, dans la plupart des tissus, les CL contiennent presque exclusivement des acides gras à 18 carbones dont 80% sont représentés par l'acide linoléique (18 :2n-6). Chez le rat, au niveau hépatique, 4 chaînes d'acide linoléique composent 57% des CL et 35% sont composés de 3 chaînes d'acide linoléique associé à une chaîne d'acide oléique (18:1) (Schlame et al., 2000).

b. Métabolisme des cardiolipines

Le métabolisme des CL nécessite deux étapes : une biosynthèse *de novo* et un remodelage. La synthèse de ce phospholipide débute de la même manière que pour les autres phospholipides avec initialement (1) formation d'acylglycérol-3-phosphate à partir de glycérol-3-phosphate, (2) formation d'acide phosphatidique après acétylation de l'acylglycérol-3-phosphate par l'acylglycérol-3-phosphate acyltransférase. Au niveau de la mitochondrie est ensuite réalisée la biosynthèse *de novo* dont la première étape est la conversion de l'acide phosphatidique en cytidine diphosphate-diacylglycérol (CDP-DAG) par la CDP-DAG synthase (CDS). Cette biosynthèse conduit à la formation de CL immature (naissant) dont la composition des chaînes latérales en acides gras n'est pas définitive. Une étape de remodelage, toujours réalisée dans la mitochondrie, est ensuite nécessaire pour former la CL mature dont la composition des chaînes latérales en acides gras sera définitive **Figure 13**.



Figure 13 : Métabolisme des cardiolipines : synthèse *de novo* et remodelage.

Source : Thèse PEYTA Laure (année 2015 – Université François-Rabelais, TOURS) CTP : Cytidine triphosphate, PA : Acide phosphatidique, CDS1 : Cytidine diphosphate diacylglycérol synthase, CDP-DAG : Cytidine diphosphate-diacylglycérol, G-3-P : Glycérol-3-phosphate, PGPS : Phosphatidylglycérol phosphate synthase, PGP : phosphatidylglycérol phosphate, PGPP : Phosphatidylglycérol phosphate phosphatase, PG : Phosphatydylglycérol, CLS1 : Cardiolipine synthase, iPLA2 : Phospholipase A2 indépendente du calcium.

PG : Phosphatydylglycérol, CLS1 : Cardiolipine synthase, iPLA2 : Phospholipase A2 indépendante du calcium, MLCL : Monolysocardiolipine, MLCLAT-1 : Monolysocardiolipine acyltransférase, TAZ : Tafazzine, TPF : Trifunctional protein, ALCAT-1 : Acyl-CoA lysocardiolipine acyltransférase-1.

i. Biosynthèse de novo

Cette biosynthèse s'effectue au sein de la membrane interne mitochondriale, en quatre étapes Figure 14 :

• <u>Formation du cytidine diphosphate-diacylglycérol (CDP-DAG)</u> :

Le groupement cytidine monophosphate (CMP) issu du cytidine triphosphate (CTP) est rattaché à l'acide phosphatidique (PA) pour former le cytidine diphosphate-diacylglycérol (CDG-DAG) grâce à l'action de la CDP-DAG synthase (CDS) (Schlame et al., 2016).

• Formation du phosphatidylglycérol phosphate (PGP) :

Cette réaction est réalisée grâce à la phosphatidylglycérol phosphate synthase (PGPS). Elle permet la formation de phosphatidylglycérol phosphate (PGP) via la substitution du groupement CMP à la molécule de CDP-DAG (Schlame et al., 2016).

• <u>Formation du phosphatydylglycérol (PG)</u>:

Le PGP est déphosphorylé en phosphatidylglycérol (PG) par la phosphatidylglycérol phosphate phosphatase (PGPP ou PTPMT1) identifiée comme une tyrosine phosphatase au niveau de la mitochondrie (Zhang et al., 2011).

• Formation de la CL immature :

Cette dernière étape de la biosynthèse aboutie à la formation de CL dites immatures (car elles ne possèdent pas leur composition en AG définitive). Cette réaction est le résultat d'une condensation entre une molécule de PG et une molécule de CDP-DAG avec élimination d'un groupement CMP. Cette étape est réalisée par la seule enzyme spécifique de cette biosynthèse : la cardiolipine synthase (CLS). Cette enzyme est localisée dans la membrane interne mitochondriale et possède un site catalytique situé du côté de la matrice mitochondriale (Schlame et al, 1993).

Biosynthèse de novo





ii. Remodelage des cardiolipines

La composition finale en acides gras des CL nécessite une étape de remodelage, conduisant à la formation de CL dites matures. Les différentes enzymes impliquées dans ce remodelage sont : une phospholipase A_2 indépendante du calcium (iPLA₂) et plusieurs acyltransférases comme la monolysocardiolipine acyltransférase (MLCLAT), l'acyl-CoA:lysocardiolipine acyltransférase-1 (ALCAT1) et la trifunctional protein (α TFP) et une transacylase, la tafazzine (Taz).

La première étape du remodelage consiste à la suppression d'une chaîne acyl latérale (déacylation) de la CL afin de former une molécule de monolysocardiolipine (MLCL) c'est-àdire une CL ne possédant que trois chaînes d'acides gras. Cette étape est réalisée par l'iPLA₂. Deux voies de remodelages sont ensuite possible :

• Un remodelage par les acyltransférases qui permettent l'ajout d'un acyl-coA sur la molécule de MLCL. Cette étape peut être réalisée par la MLCLAT, l'ALCAT-1 ou la sousunité α de la TFP.

• Un remodelage par une transacylase (Taz) permettant le transfert direct d'un groupement acyl d'un phospholipide à un autre phospholipide.

1. Remodelage par la monolysocardiolipine acyltransférase : MLCLAT

Cette enzyme est retrouvée au sein des membranes mitochondriales (Ma et al., 1999). Elle permet la réacylation de MLCL via l'utilisation de linoléoyl-CoA (Schlame et al., 1990). Elle présente une plus forte affinité pour les formes acylés des acides gras insaturés comme l'acide linoléïque (18:2-CoA) et de l'acide oléïque (18:1-CoA) que pour la forme acylé des acides gras saturés comme l'acide palmitique (16 :0-CoA) (Taylor et al., 2003).

2. Remodelage par l'acyl-CoA:lysocardiolipine acyltransférase-1 : ALCAT1

Cette enzyme est localisée au niveau des membranes associées à la mitochondrie, dans le réticulum endoplasmique, contrairement aux autres enzymes nécessaires au métabolisme des CL qui elles se trouvent dans la mitochondrie (Cao et al., 2004). Elle permet le remodelage d'autres phospholipides comme le PI ou la PG en plus des CL.

3. Remodelage par la trifunctional protein : αTFP

La protéine TFP est une protéine multifonctionnelle localisée dans la membrane interne mitochondriale et est impliquée dans la dégradation des acides gras à longues chaînes lors de la β -oxydation. Il a été montré *in vitro* que l' α TFP permet l'acylation des MLCL en CL (Taylor et al., 2012). Récemment, le rôle de l' α TFP dans le remodelage a été confirmé dans un modèle de souris KO. Une modification de la composition diminution des CL composés de 4 chaînes d'acide linoléique et de 3 chaînes d'acide linoléique) et de la quantité des CL a pu être observée dans les animaux KO (Mejia et al., 2015).

4. Remodelage par la tafazzine : Taz

La Taz permet le transfert direct d'un groupement acyl de la phosphatidyléthanolamine ou de la phosphatidylcholine à une molécule de MLCL. Cette enzyme est codée par le gène *TAZ* situé sur la région q28 du chromosome X (Bione et al., 1996). Les patients atteints du syndrome de Barth, possèdent des mutations du gène *TAZ* qui se traduisent par un moins bon fonctionnement de la Taz ayant pour conséquence une altération de la composition des CL de leurs mitochondries (plus faible incorporation de l'acide linoléique) aboutissant à une augmentation de la quantité de MLCL (Vreken et al., 2000).

c. Cardiolipines et fonctions mitochondriales

Principalement localisé au niveau de la membrane interne, ce phospholipide interagit avec de nombreuses protéines mitochondriales comme les différents complexes protéiques qui composent le système de phosphorylation oxydative.

i. Cardiolipines et complexes protéiques de la phosphorylation oxydative

• <u>Interaction avec le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) :</u>

Plusieurs études ont permis d'établir une relation entre l'activité du complexe I et les CL. A partir de mitochondries purifiées de cœur de bœuf, 10 sites de contact entre le complexe I et les CL ont été mis en évidence. (Sharpley et al., 2006). De plus, il a été démontré que l'absence de CL entrainait une diminution importante de l'activité de ce complexe dans un modèle de mitochondries isolées de cœur de bœuf ou sur levure. Cependant cette diminution de l'activité peut être partiellement reversée par d'autres phospholipides comme la PC et la PE (Fry et al., 1981) et (Paradies et al., 2002) et (Dröse et al., 2002).

L'environnement lipidique influe donc sur l'activité du complexe I. Le fonctionnement optimal de ce complexe nécessite la présence de CL.

• Interaction avec le complexe II (Succinate-ubiquinone-oxydoréductase) :

Peu d'études se sont intéressées à la régulation du fonctionnement du complexe II par les CL. Néanmoins, deux études récentes réalisées à l'aide de nanodisques (bicouche lipidique entourée par une protéine amphiphile) de composition en phospholipides variables, ou sur mitochondries issues de cellules myéloïdes progénitrices, ont permis de démontrer que la présence de CL serait nécessaire à la stabilité, l'assemblage et l'activité du complexe II (Schwall et al., 2012) et (Vergeade et al., 2016).

• <u>Interaction avec le complexe III (ubiquinone-cytochrome c –réductase) :</u>

La suppression de CL entraine une déstabilisation du complexe III se traduisant par la dissociation de ses sous-unités aboutissant à une perte quasi-complète de son activité (Gomez et al., 1999). Plus récemment, la perte d'activité du complexe III a été attribuée à la perte du contenu en CL dans les mitochondries issues de cœur de rat, dans un processus d'ischémie/reperfusion (Petrosillo et al., 2003).

• <u>Interaction avec le complexe IV (cytochrome c oxydase) :</u>

La CL semble un composant nécessaire au bon fonctionnement de ce complexe (transport des électrons + pompage de protons vers l'espace intermembranaire). Des sites de liaisons avec les CL ont été identifiés sur ce complexe à partir de complexe isolé de cœur de bœuf dont deux présentant une forte affinité et deux autres une affinité plus faible (Robinson, 1982). Les sites à faible affinité sont associés au maintien de la structure du complexe IV, en stabilisant les sous-unités VIa et VIb qui sont nécessaires à sa formation. Les deux sites à forte affinité sont associés au transfert des électrons. L'absence de CL au niveau de ces sites entraine une diminution de l'activité de ce complexe d'environ 50% tandis que l'ajout de CL exogène permet de rétablir une activité normale (Sedlák et al., 1999).

• <u>Interaction avec la F0/F1 ATP synthase :</u>

Les CL sont étroitement liées à ce complexe (Beyer et al., 1985). L'expérience réalisée par l'équipe de Achean *et al.*, sur des muscles de drosophiles mutées pour le gène de la CLS et donc présentant una faible quantité de CL, a permis de démontrer que ces phospholipides sont importantes pour le degré d'oligomérisation de l'ATP synthase. Ainsi en absence de CL, l'oligomérisation de ce complexe est diminuée ce qui se traduit par une perte de son activité (Acehan et al., 2011).

• <u>Interaction avec les supercomplexes :</u>

Il semble que l'assemblage des complexes ou « supercomplexes » requiert la présence de CL. L'étude réalisée par Bazàn *et al.* en utilisant des complexes III et IV purifiés et des liposomes de composition en phospholipides différentes démontre une faible formation de « supercomplexes » quand les liposomes sont composés de PC et de PE. En revanche, l'addition de CL dans les liposomes entraine la formation de « supercomplexes » composés comme suit : III₂+IV₂ (Bazàn et al., 2013).

• <u>Interaction avec les transporteurs mitochondriaux :</u>

Les CL facilitent le transport du cytochrome c entre les complexes III et IV en stabilisant ce « supercomplexe » avec l'ANT. En l'absence de CL, la distance entre les complexes III et IV et l'ANT est augmentée, ceci se traduit par une perte de l'efficacité de la phosphorylation oxydative. (Claypool et al., 2008). Les CL sont aussi requises dans l'activité des transporteurs du phosphate, du pyruvate, du citrate mais aussi pour la navette carnitine-acylcarnintine (Paradies et al., 2009).

Les différents effets des CL sur les complexes respiratoires mitochondriaux et les « supercomplexes » sont répertoriés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Rôle des CL sur la structure et l'activité des complexes du système de phosphorylation oxydative

	Activité	Références
Complexe I	Dix sites de contact Diminution de l'activité en absence de CL	(Fry et al., 1981), (Sharpley et al., 2006), (Paradies et al., 2002)
Complexe II	Diminution de la stabilité et de l'activité en absence de CL	(Schwall et al., 2012), (Vergeade et al., 2016)
Complexe III	Déstabilisation du complexe et diminution de son activité en absence de CL	(Gomez et al., 1999), (Petrosillo et al., 2003)
Complexe IV	Quatre sites de liaisons Déstabilisation des sous-unités Diminution de l'activité en absence de CL (transfert d'électrons plus faible)	(Robinson, 1982), (Sedlák et al., 1999)
ATP synthase	Rôle dans l'oligomérisation (transport des protons facilité)	(Acehan et al., 2011)
Supercomplexes	Perte de l'assemblage des complexes III/IV Perte de l'efficacité de la phosphorylation oxydative en absence de CL	(Bazàn et al., 2013)

ii. Cardiolipines et métabolisme énergétique mitochondrial

L'activité des complexes respiratoires et l'assemblage des « supercomplexes » est affecté par les CL. Plusieurs études mettent en évidence des modifications du métabolisme énergétique dans des modèles présentant des altérations de la quantité en CL.

Des études réalisées sur levure ne possédant pas le gène de la CLS ($\Delta CDR1$) montrent qu'une perte totale de CL au sein des membranes mitochondriales est associée à une diminution des activités enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire, une diminution de la consommation d'oxygène liée à l'activité maximale et une diminution du rapport ATP/O (Jiang et al., 2000). L'étude réalisée par Kiebish et al., a montré une diminution de la forme matures de CL ainsi qu'une composition altérée des CL sur mitochondries extraites de tumeurs cérébrales en comparaison de mitochondries extraites de tissus normaux. Ces anomalies des CL étaient associées à une réduction des activités enzymatiques de chacun des complexes respiratoires (I, I+III et II+III). Ces observations suggérant un défaut du métabolisme des CL dans les cellules cancéreuses. (Kiebish et al., 2008).

Notre laboratoire a pu démontré, dans des mitochondries isolées d'hépatomes (HepaRG) dont le gène de la CLS a été invalidé de manière permanente (sh*CLS*), une diminution de la quantité de CL entrainant une diminution de la consommation d'oxygène pour tous les complexes de la chaîne respiratoire suggérant une diminution globale du fonctionnement de celle-ci. Dans ce modèle le rendement énergétique (rapport ATP/O) est augmenté (Peyta et al., 2016). Ceci serait la conséquence d'une fragmentation du réseau mitochondrial pouvant être à l'origine des effets observés. Dans un autre modèle pathologique (chez le rat hypothyroïdien), la faible quantité de CL entraine une plus faible consommation d'oxygène et un rapport ATP/O augmenté (Paradies et al., 1991) et (Nogueira et al., 2002). Cependant dans ces études le mécanisme permettant de relier la diminution du contenu en CL et l'augmentation du rapport ATP/O n'est pas discuté. Il se pourrait que la diminution de la consommation d'oxygène observée soit le résultat d'un gaspillage énergétique plus faible pouvant ainsi permettre une augmentation du rapport ATP/O.

A l'inverse lorsque la quantité de CL est augmentée, il semble que l'efficacité de la synthèse d'ATP mitochondriale soit diminuée. Notre laboratoire a pu mettre en évidence, dans des mitochondries hépatiques de rats cachectiques, une corrélation positive entre l'augmentation du gaspillage énergétique et une augmentation de contenu en CL. Il en résulte une diminution de la phosphorylation oxydative et par conséquent une diminution du rapport ATP/O (Dumas et al., 2011). L'ajout exogène de CL, par une système de liposome sur mitochondries hépatiques de rat, entraine un découplage mitochondrial se traduisant par une diminution de la consommation d'oxygène liée la synthèse d'ATP (diminution du rapport ATP/O) se traduisant par un gaspillage énergétique plus important (Julienne et al., 2014). Des résultats similaires ont été obtenus quand l'augmentation du contenu en CL est faite par ajout *in vitro* de CL sur des mitochondries d'hépatocytes (Bobyleva et al., 1997).

En conclusion, une diminution du contenu en CL serait associée à un meilleur rendement énergétique, à l'inverse l'augmentation du contenu en CL serait associée à une diminution du rendement énergétique via une augmentation du gaspillage énergétique **Figure 15**.



Figure 15 : Effets du contenu en CL sur le métabolisme énergétique mitochondrial.

En plus de sa quantité, la composition des chaînes latérales des CL semble être un facteur important dans la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial.

La limitation de l'apport alimentaire en acides gras polyinsaturés ou en 18 :2n-6 (composants majoritaires des chaînes latérales des CL) se traduit par une diminution de la consommation d'oxygène ainsi que par une augmentation du gaspillage énergétique suite à une modification de la composition de ce phospholipide (Chicco et al., 2007) et (Fontaine et al., 1996).

L'utilisation d'un régime riche en acides gras saturés a permis de mimer une stéatose hépatique non-alcoolique. Dans ce contexte, une augmentation de l'expression génique du gène de la CLS est associée à une augmentation du contenu en CL, ainsi qu'à une modification de la composition des CL en acides gras (+40% de 18 :2n-6 dans les CL avec régime enrichi à 30% par des acides gras saturés). L'activité de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase semble altérée dans les mitochondries des animaux ayant reçus ce régime (Aoun et al., 2012).

Notre laboratoire a aussi démontré que la composition en acides gras polyinsaturés (n-6 et n-3) des chaînes latérales des CL semble affecter le fonctionnement mitochondrial. En effet, les mitochondries hépatiques des rats cachectiques se caractérisaient par une diminution du rapport n-6/n-3 dans les CL conduisant à une augmentation du gaspillage énergétique (Dumas et al., 2011).

Le régime alimentaire peut être un facteur déterminant de la composition des chaînes latérales CL et influencer l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale.

L'impact des acides gras polyinsaturés n-3 sur la composition des CL et les effets engendrés par cette incorporation, dans le cadre d'une chimiosensibilisation, sont détaillés dans le chapitre I – partie E.

La perte progressive de la forme L₄-CL (CL composée de quatre chaînes d'acide linoléique) au cours du processus de vieillissement conduit à une diminution de l'activité du complexe IV mitochondrial dans les mitochondries cardiaques. Cette perte de la forme L₄-CL pouvant être attribuable à une diminution du remodelage (Sparagna et al., 2007). Une perte de la forme L₄-CL peut aussi apparaitre dans un autre contexte pathologique, le syndrome de Barth. Dans ce contexte, une perte du contenu en L₄-CL conduit à une accumulation de la forme monolysocardiolipine (MLCL - précurseur des CL matures – ne contenant que trois chaînes latérales d'acides gras) entrainant ainsi une déstabilisation des complexes respiratoires et par conséquent des dysfonctionnements mitochondriaux (McKenzie et al., 2006).

iii. Cardiolipines et peroxydation lipidique

Les chaînes latérales des CL principalement composées d'acides gras polyinsaturés ainsi que leur proximité avec les sites de production d'ERO (complexe I et III mitochondriaux) font de ce lipide une cible privilégiée des ERO.

Ainsi, l'exposition de mitochondries isolées de cœur de bœuf aux ERO (anion superoxyde) entraine une inactivation des complexes I, III et IV mitochondriaux ainsi qu'une oxydation/déplétion en CL. Cependant, il n'est pas clairement défini dans cette étude si les effets observés étaient dus à la peroxydation des chaînes latérales des CL ou à la diminution de la quantité de CL normale (CL non péroxydée) ou à l'association de ces deux phénomènes (Paradies et al., 2014).

Durant le phénomène d'ischémie/reperfusion, la production d'ERO entraine une diminution de la quantité de CL en raison de la peroxydation lipidique induite. Cette diminution semble être responsable en partie d'une diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexes I et III) observée (Paradies et al., 2004). Dans ce contexte, l'ajout exogène de CL non peroxydées entraine une restauration des activités enzymatiques des différents complexes respiratoires (Paradies et al., 2004), (Petrosillo et al., 2003). En conclusion, la diminution de la quantité de CL (dégradation des CL peroxydées) induite par les ERO peut entrainer des altérations du fonctionnement de la phosphorylation oxydative (diminution de l'activité enzymatiques des complexes respiratoires) pouvant possiblement se répercuter par une augmentation de la production d'ERO et ainsi perpétuer un cycle de génération d'ERO et de dommages mitochondriaux.

iv. Cardiolipines et mort cellulaire

Ce phospholipide est aussi impliqué dans les différents processus de mort cellulaire. Une étude réalisée sur des mitochondries cardiaques a montré que l'ajout exogène de CL peroxydées conduit à une ouverture précoce du mPTP suite à un gonflement de la matrice mitochondriale, à une libération du cytochrome c et à un relargage du calcium intramitochondrial. En revanche, l'ajout de CL non peroxydées n'entraine aucun des effets précédemment observés (Petrosillo et al., 2006). Une relation entre le calcium et les CL a été mise en évidence par l'équipe de Brustovetsky *et al*. Grâce à l'utilisation de mitoplastes (mitochondrie sans membrane externe), cette équipe a démontré que le calcium diminuait l'interaction entre les CL et l'ANT (interaction entre les ANT peut être médiée par les CL), entrainant la transition de l'ANT au niveau du mPTP et son ouverture (Brustovetsky et al., 1996).

En condition physiologique, le cytochrome c interagit avec les CL au niveau de deux sites de contact (interaction électrostatique avec les charges négatives des CL et interaction hydrophobique avec les acides gras des chaines latérales des CL) (Paradies et al., 2009). La peroxydation de la CL suite à la production excessive d'ERO entraine une diminution de son interaction avec le cytochrome c et permet sa libération dans le cytosol (Kagan et al., 2005).

L'activation du récepteur Fas, lors du processus d'apoptose extrinsèque, entraine une translocation des CL de la membrane interne mitochondriale vers la membrane externe mitochondriale où elles peuvent servir de plateforme pour l'ancrage et l'activation de la caspase 8 et de protéine tBid. En effet, la présence de la protéine tBid a été rapportée au niveau de domaines riches en CL. L'activation de ces protéines conduit à l'oligomérisation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak provoquant ainsi le relargage du cytochrome c dans le cytosol (Paradies et al., 2014).

Cette présence de CL au niveau de la membrane externe peut aussi servir de signal unique pour la dégradation de mitochondries par le processus de mitophagie. L'analyse de la structure de la protéine LC3 (impliquée dans la formation de l'autophagosome), par cristallographie, a permis de démontrer une liaison directe avec les CL au niveau de ses groupements N-terminaux. Cette protéine semble se lier de manière plus forte aux CL dont les chaînes latérales sont composées par quatre acides linoléiques (Hsu et al., 2016).

En conclusion, les CL sont considérées comme la signature lipidique des mitochondries. La composition en acides gras ainsi que la quantité et la concentration en CL peroxydées régulent les différentes fonctions mitochondriales (métabolisme énergétique, production d'ERO et mort cellulaire). Le graphique ci-dessous récapitule les différents effets des CL au niveau mitochondrial **Figure 16**.



Figure 16 : Effets des CL sur les différentes fonctions mitochondriales.

C. Le cancer du sein et la doxorubicine

a. Le cancer du sein

Sources : (Mehrgou et al., 2016), www.epathologies.com, www.ipubli.inserm.fr et www.ligue-cancer.net.

Avec 53 000 nouveaux cas par an et 11 500 décès annuels, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et représente environ 33,5% de l'ensemble des nouveaux cas de cancer diagnostiqués chez la femme. L'âge moyen du diagnostic est situé entre 61 et 63 ans (www.ligue-cancer.net).

Le sein est constitué de Figure 17 :

• La <u>glande mammaire</u> : elle se compose de quinze à vingt lobes, eux-mêmes constitués de lobules. Ces lobules ont pour fonction de sécréter le lait en période d'allaitement. Celui-ci sera transporté jusqu'au mamelon grâce aux canaux galactophores.

• Le <u>tissu de soutien</u> : celui-ci est composé de tissu adipeux, de fibres et de vaisseaux sanguins.

Le développement de la glande mammaire ainsi que son fonctionnement est soumis à l'influence des hormones sexuelles ovariennes : les œstrogènes et la progestérone.



Figure 17 : Anatomie du sein. Source : www.ligue-cancer.net L'épithélium mammaire est constitué des deux types de cellules différenciées :

• Les cellules luminales : elles bordent la lumière des canaux galactophores et des lobules. Ces cellules expriment les marqueurs associés aux récepteurs des oestrogènes et de la progestérone ainsi que certaines cytokératines (CK8 et CK18).

• Les cellules myoépithéliales : elles entourent les cellules luminales et sont en contact avec la lame basale et le stroma. Ces cellules sont insensibles aux œstrogènes et à la progestérone.

L'épithélium mammaire est aussi constitué des cellules souches et de cellules progénitrices capables de se différencier en cellules luminales ou myoépithéliales (http://www.ipubli.inserm.fr).

La grande partie des cancers mammaires se développe sous forme d'un adénocarcinome (adéno : glande – carcinome : cellule épithéliale) au niveau des canaux galactophores (cancer canalaire) ou plus rarement au niveau des lobules (cancer lobulaire). On parle de cancer non invasif (ou *in situ*) quand les cellules cancéreuses n'infiltrent pas les tissus avoisinants et de cancer invasif (ou infiltrant) quand les cellules cancéreuses ont envahi les tissus voisins. Les cellules cancéreuses invasives peuvent se repandre dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et conduire à la formation de métastases (os, foie, poumons, cerveau) (https://www.ligue-cancer.net).

Le cancer du sein possède une forte hétérogénéité moléculaire et est définit en cinq soustypes (Mehrgou et al., 2016) (identifiés sur l'expression transcriptionnelle de plusieurs gènes) : « Luminal A », « Luminal B », « Basal (triple négatives) », « ERBB2 (HER2 type) », « Claudin-low » et « Normal » :

• Luminal A (60% des cancers du sein) : ce sous-type de cancer est considéré de bas grade. Les cellules tumorales présentent une expression positive pour les récepteurs hormonaux (œstrogène et/ou progestérone) mais négative pour le récepteur HER2 (RE+ et/ou RP+ et HER2-). Ce cancer possède une évolution favorable et peu de recrudescence.

• Luminal B (20% des cancers du sein) : les cellules cancéreuses de type Luminal B présentent une expression positive pour les récepteurs aux œstrogènes et/ou à la progestérone ainsi que pour HER2 (RE+ et/ou RP+ et HER2+/-).

• Basal (triple négative) (10% des cancers du sein) : les cancers du sous-type basal ou triple négatif sont considérés comme cancer de haut grade, avec une expression négative des

récepteurs hormonaux et de HER2 (RE-, RP- et HER2-). Le type de cellules tumorales impliqué dans le phénotype triple négatif possède des caractéristiques similaires aux cellules basales bordant les canaux galactophores. Ces tumeurs sont souvent très agressives et présentent un mauvais diagnostic.

• HER2 (10% des cancers du sein) : ces cancers présentent souvent une expression négative des récepteurs hormonaux mais une forte expression de HER2 (RE-, RP- e HER2+).

i. Traitement du cancer par la doxorubicine

Les anthracylines sont largement utilisées dans le cadre d'un traitement néo-adjuvant (avant chirurgie) d'un cancer du sein offrant ainsi la possibilité d'une rémission totale mais aussi dans le cadre d'un traitement adjuvant.

La doxorubicine est commercialisée sous le nom d'Adriablastine® et sa posologie moyenne est de 40 à 75 mg/m² toutes les 3 à 4 semaines avec une dose maximale cumulative de 450 à 500 mg/m² (Jain, 2000). Cette drogue est administrée par voie intraveineuse.

Les associations à d'autres médicaments dans le cadre d'une polychimiothérapie sont : le protocole FAC (5-fluorouracile, doxorubicine, cyclophosphamide) et le protocole FEC (5-fluorouracile, épirubicine (analogue non cardiotoxique), cyclophosphamide). Ces protocoles de chimiothérapie se font généralement par 4 à 6 séances de perfusion intraveineuse espacées chacune de 3 semaines. La doxorubicine fait aussi partie d'autres protocoles utilisés en chimiothérapie comme le protocole AC (adriamycine, cyclophosphamide) et le protocole TAC (docétaxel, adriamycine, cyclophosphamide) (www.e-cancer.fr les traitements des cancers du sein guides patients).

Le traitement thérapeutique à base de doxorubicine présente des nombreux effets secondaires se traduisant par des nausées, des vomissements, une toxicité hématopoïétique, une alopécie ainsi qu'une toxicité cardiaque (Octavia et al., 2012).

ii. Limitations à l'utilisation de la doxorubicine

L'utilisation des anthracyclines et notamment de la doxorubicine en clinique s'accompagne d'un risque de cardiotoxicité de manière dose dépendante pouvant évoluer vers une insuffisance cardiaque sévère et irréversible. L'apparition d'une insuffisance cardiaque apparait dans 2% des cas après une dose cumulative de 300 mg/m² ou moins, dans 7% des cas à 550 mg/m² et jusqu'à 20% quand la dose excède les 700 mg/m² (Jain, 2000). Les lésions cellulaires cardiaques induites par l'administration de cette molécule se traduisent par

- 61 -

l'apparition d'un gonflement du réticulum sarcoplasmique et de vacuoles lipidiques dans le cytoplasme pouvant être observables par microscopie électronique (Jain, 2000). Pour limiter ces effets secondaires différents analogues ont été développés : comme l'épirubicine et l'idarubicine.

L'épirubicine est un dérive semisynthétique de la doxorubicine obtenu par épimérisation de l'hydroxyl en position C4 de la daunosamine. Ce changement de position a peu d'effet sur le mode d'action de l'épirubicine mais diminue sa cardiotoxicité. En pratique, la dose médiane présentant une cardiotoxicté est de 935 mg/m² pour l'épirubicine et de 468 mg/m² pour la doxorubicine.

Le développement de système liposomal encapsulant la doxorubicine a été étudié afin de réduire sa cardiotoxicité. Ce système liposomal permet à la drogue d'échapper à la détection/destruction par le système immunitaire et d'augmenter le temps de la demi-vie dans la circulation sanguine. Deux sortes de systèmes liposomales peuvent être utilisées :

• Le liposome pégylé (Doxil[®]/Caelyx[®]) : la doxorubicine est incluse dans un liposome formé de polyéthylène glycol. Cependant l'utilisation de cette formulation est limitée par l'apparition d'un « syndrome pied-main » caractérisé par l'apparition de rougeurs et/ou fourmillements au niveau de la paume de main et de la plante des pieds (www.doxil.com)

• Le liposome non pégylé (Myocet[®]) : ce liposome possède une taille d'environ 180 nm dont la partie lipidique est composé de phosphatidylcholine et de cholestérol (sans ajout de polyéthylène glycol). Ce nouveau système d'encapsulation de la drogue permet une distribution au sein de l'organise sans les effets secondaires comme le « syndrome pied-main ». (www.fda.gov)

La cardiotoxicité liée à la doxorubicine peut aussi être limitée par l'utilisation de molécules (Jing Zhang et al., 2016) :

- Les beta-bloquants : carvedilol, nebivolol, metoprolol
- Les antioxydants : resvératrol, coenzyme Q10, N-acétylcystéine. Cependant, l'utilisation d'antioxydants diminue l'efficacité de l'agent utilisé dont l'un de ses modes d'actions est la synthèse de radicaux libres.

Les points limitant quant à l'utilisation des anthracyclines dans le traitement des cancers mammaires est la présence d'une forte cardiotoxicité et l'apparition d'un phénomène de résistance caractérisé par (http://www.ipubli.inserm.fr) :

- une augmentation du flux sortant de la molécule via des transporteurs ATP dépendants présents au niveau des membranes cellulaires
- une altération de sa principale enzyme cible, la topoisomérase II
- une diminution de l'activité du cytochrome P450 réductase, nécessaire à sa métabolisation et son élimination
- une augmentation des enzymes de détoxifications comme la SOD, la catalase ou encore les GPx.

b. La doxorubicine

La doxorubicine est un agent anti tumoral de la famille des anthracyclines, isolé dans les années 1960 à partir d'une souche de bactérie mutée de *Streptomyces peucetius* (Arcamone et al., 1969). Le suffixe –rubicine fait référence à la couleur rouge de cette molécule.

i. Structure moléculaire

Sa structure est formée d'un groupement aglycone relié à un sucre (glucosamine).

La partie aglycone (anthraquinone) se compose des groupes quinone-hydroquinone (noyaux B et C), d'un méthoxy en position C4 du noyau D et d'une chaîne courte latérale en C9 se terminant par un alcool primaire.

Le groupement sucré est composé par la daunosamine. Il est relié à l'aglycone au niveau du noyau A par une liaison glycoside **Figure 18** (Minotti et al., 2004).

Groupement aglycone



Figure 18 : Structure de la doxorubicine. Modifié d'après (Minotti et al., 2004)

ii. Mécanisme de diffusion

La doxorubicine se comporte comme une base faible (pKa = 8,22). En condition physiologique (pH = 7,2), une fraction de cette molécule (groupement aglycone) n'est pas protonée et peux donc interagir avec les régions lipidiques (régions hydrophiles) de la bicouche membranaire. La doxorubicine diffuse au travers des membranes de manière passive par un mouvement de « flip-flop ». Cette diffusion passive peut entrainer des altérations des membranes biologiques (Jung et al., 2001).

L'efflux de cette molécule en dehors des cellules peut se faire lorsque cette dernière possède des pompes d'efflux comme par exemple la pompe d'efflux P-gp au niveau des cellules intestinales. Cet efflux peut aussi être présent dans des cellules cancéreuses développant des mécanismes de résistance ou il est assuré par des transporteurs comme la P-gp, BCRP ou MRP1 (Chapitre I - partie D).

iii. Mécanismes d'actions

• Liaison à l'ADN – Inhibition de la topoisomérase II :

Au pH intracellulaire, le groupement sucré de la doxorubicine possède une charge positive ce qui permet à la drogue de s'intercaler au niveau de l'ADN. Cette liaison conduit à des cassures des doubles brins d'ADN ainsi qu'à la fragmentation des noyaux et à une condensation de la chromatine ayant pour résultats l'induction de l'apoptose dans ces cellules (Meredith et al., 2016).

L'ADN topoisomérase II est une enzyme qui sépare les brins d'ADN lors des phases de transcription, de réplication et de réparation. La doxorubicine agit en stabilisant le complexe ADN-toposiomérase II et empêche le raccord entre les brins d'ADN clivés, conduisant à la mort de la cellule. La doxorubicine forme un complexe doxorubicine-ADN-topoisomérase II stabilisant les doubles brins d'ADN coupés (Meredith et al., 2016).

• <u>Production d'ERO :</u>

La doxorubicine, dans sa forme initiale, n'est pas toxique. La première réaction de dégradation entraine la formation de radicaux libres suite à l'addition d'un électron au niveau du noyau quinone (noyau C). Cette réaction entraine la formation d'un radical semiquinone par une réduction enzymatique réalisée par de nombreuses enzymes de type NADPH-oxydoréductase comme NADH cytochrome p450 réductase et la NADH-ubiquinone oxydoréductase (complexe I mitochondrial). En présence d'oxygène, la forme semiquinone est instable et subit une oxydation conduisant à la perte de son électron et à la formation de radicaux libres (superoxyde) ou de radicaux oxygénés (peroxyde d'hydrogène) **Figure 19** (Minotti et al., 2004).



Figure 19 : Cycle de réduction de la doxorubicine.

Le retour à la forme initiale parentale peut se faire suite à la réduction de la forme semiquinone et à la formation du radical hydroxyle et de l'anion superoxyde. La réduction de

la forme semiquinone avec l'ion ferrique (Fe³⁺) par la réaction d'Haber-Weiss peut aussi redonner la forme doxorubicine intiale. L'ion Fe³⁺ se lie avec la forme semiquinone pour former un complexe stable : Fe³⁺-semiquinone qui subit une réaction d'oxydoréduction conduisant à la formation du complexe : Fe²⁺-doxorubicine. Ce complexe peut céder son électron supplémentaire afin de former un radical O_2^{-} (ion superoxyde) en réaction avec l'oxygène (Jung et al., 2001).

iv. Effets de la doxorubicine sur les mitochondries

• Effet sur l'ADN mitochondrial :

Au niveau mitochondrial, l'utilisation de la doxorubicine entraine des altérations de l'ADN de cet organite conduisant à une diminution de l'expression des complexes I et IV de la chaîne respiratoire et à une augmentation de la formation d'ERO. Cet effet pouvant être un mécanisme impliqué dans la cardiotoxicité de cette molécule (Lebrecht et al., 2003). L'utilisation de la sonde PicoGreen a permis pour la première fois de mettre en évidence une interaction directe entre le doxorubicine et l'ADN mitochondrial dans des fibroblastes (Ashley et al., 2009).

• Effet sur les lipides mitochondriaux :

La doxorubicine présente une forte affinité de liaison pour les CL (Goormaghtigh et al., 1986) et (Parker et al., 2001). C'est grâce à l'amine située en position 3' de la daunosamine que l'interaction est possible entre cette molécule et les CL. Des modifications dans cette partie de la drogue entrainent une perte de l'affinité de celle-ci pour les CL (Praet et al., 1993). *In vivo*, la liaison entre les CL et la doxorubicine au sein des cardiomyocytes conduit à une délocalisation des CL de l'environnement lipidique des complexes respiratoires et entraine une inhibition de ces complexes (complexes I-III et IV) (Goormaghtigh et al., 1986).

Les liaisons doxorubicine-CL peuvent être de deux natures en fonction du rapport moléculaire entre ces deux molécules : (1) un fort rapport 2 :1 (deux molécules de doxorubicine pour une molécule de CL) et la drogue reste en dehors de la couche lipidique ou elle sera réduite par le complexe I et (2) un rapport plus faible entraine l'intégration de la drogue par son groupement aglycone dans la couche lipidique ou sa réduction sera plus difficile (Fiallo et al., 1986).

• Induction de l'apoptose mitochondriale :

Dans différents modèles mitochondriaux (cellules cardiaques ou cellules cérébrales), un traitement par la doxorubicine entraine une ouverture du mPTP et un relargage du calcium mitochondrial dans le cytoplasme (Solem et al., 1994) et (Cardoso et al., 2008). Dans des mitochondries issues d'adénocarcinome mammaire, une forte dose de doxorubicine entraine une libération du cytochrome c suite à une diminution du potentiel de membrane mitochondrial (Huigsloot et al., 2002).

Ainsi cette drogue peut conduire à la mort cellulaire suite à l'induction de l'ouverture du mPTP.

• Effets sur la phosphorylation oxydative :

De part ses interactions spécifiques avec les CL, la doxorubicine peut avoir des effets au niveau du métabolisme énergétique mitochondrial.

La doxorubicine peut conduire à une inhibition de la phosphorylation oxydative et de la synthèse d'ATP au niveau des mitochondries (mitochondries hépatiques, cardiaques ou issues de cellules tumorales de sarcome d'Ehrlich) suite à une diminution de la consommation d'oxygène liée à la synthèse d'ATP (Gosalvez et al., 1974) et (Bianchi et al., 1987).

Dans un modèle de mitochondries cardiaque, l'ajout de doxorubicine entraine une augmentation de l'activité des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cet effet semble être due à la formation d'un complexe de type « ubiquitine-like » entre la doxorubicine et les CL rendant ainsi le transfert des électrons facilité entre le NADH et le cytochrome c (Goormaghtigh et al., 1983).

L'effet de la doxorubicine semble dépendre de la concentration et du type de cellules utilisés. Dans les cellules Jurkat (hypersensibles) et HL-60 (sensibles), une concentration de 1 μ M stimule la respiration mitochondriale à l'état basal et permet une augmentation du contenu en ATP intracellulaire (Souid et al., 2005). A l'inverse, dans les cellules leucémiques HL-60 (sensibles), une forte concentration (20 μ M) conduit à une diminution de la consommation d'oxygène à l'état basal. En revanche, sur les mitochondries des cellules résistantes HL-60 aucun effet n'a été observé (Tao et al., 2006).

• Effets sur la production d'ERO et la peroxydation lipidique :

La mitochondrie participant à la production d'ERO (Chapitre I – partie A), cet organite est plus susceptible aux dommages oxydatifs que le reste des organites intracellulaires. Le complexe I de la chaîne respiratoire participe à la réduction de la doxorubicine en radical semiquinone via son groupement flavine (activité NADH déshydrogénase) (Doroshow et al., 1986) et (Thayer, 1977).

In vivo, la doxorubicine induit à la formation de malondialdéhyde (marqueur de la peroxydation lipidique) chez la souris. Un prétraitement d' α -tocophérol (vitamine E – antioxydant) protège contre la peroxydation des lipides (Myers et al., 1977). *In vitro*, l'incubation de cellules leucémiques HL-60 (sensibles au stress oxydant) avec une concentration de doxorubicine de 1 μ M, conduit à des dommages de l'ADN suite à la production de peroxyde d'hydrogène (Mizutani et al., 2005).

L'utilisation d'antioxydant comme l' α -tocophérol ou le MitoTempo (spécifique de la mitochondrie) conduit à une baisse de la peroxydation lipidique suite à une diminution de la production de malondialdéhyde induite par la doxorubicine (Benchekroun et al., 1992) et (Rocha et al., 2016).

Les cellules disposent des plusieurs enzymes antioxydantes afin de contrer cette production de radicaux libres induite par la doxorubicine. Ainsi, au niveau mitochondrial, une surexpression de la Mn-SOD (élimination des ions superoxydes) conduit à une diminution de la cardiotoxicité de manière dose-dépendante dans un modèle de souris transgénique (Yen et al., 1996). De plus, l'augmentation de l'activité de la Mn-SOD suite à un prétraitement par le resvératrol (polyphénol) conduit à une diminution de la production d'ERO dans les cardiomyocytes traités (Danz et al., 2009). Dans un modèle de glioblastome résistant à la doxorubicine, l'augmentation des activités de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase participe à la résistance et permet une diminution de la peroxydation lipidique suite à une diminution de la formation d'ion superoxyde induite par la doxorubicine (Benchekroun et al., 1993).

En conclusion, les effets délétères d'un traitement par la doxorubicine, au niveau mitochondrial, sont dûs à : (1) une forte affinité pour les lipides (CL) induisant des dommages au niveau de la membrane mitochondriale, (2) une production d'ERO pouvant conduire à un stress oxydant et à la peroxydation lipidique et (3) une libération du cytochrome c, probablement due aux dommages membranaires suivi par un déclenchement de la cascade apoptotique.

v. Ciblage de la mitochondrie par la doxorubicine

Le ciblage de la mitochondrie dans les cellules cancéreuses, a fait l'objet ces dernières années de nombreuses recherches, en raison de son rôle clé au sein de la cellule cancéreuse (régulation du métabolisme, production d'énergie et mort cellulaire). L'intérêt de cibler cet organite est notamment étudié dans le phénomène de résistance thérapeutique.

Différentes groupements ont été greffés sur la doxorubicine pour cibler la mitochondrie :

• Le groupement triphénylphosphonium : dans un modèle de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 résistantes (Han et al., 2014).

• Le groupement mitochondria-penetrating peptide : dans des cellules HeLa (Chamberlain et al., 2013).

L'utilisation de liposomes « mitocancerotropic » formulés à l'aide d'un acide folique et d'un groupement triphénylphosphonium permet d'augmenter la quantité de doxorubicine accumulée dans les mitochondries des cellules cancéreuses KB (carcinome de l'oesophage) et la mort cellulaire (Malhi et al., 2012).

L'utilisation de particules conjuguées composées d'un groupement tocopheryl succinate (ciblage la mitochondrie) combiné à la doxorubicine permet d'entrainer (1) des dommages au niveau de la morphologie mitochondriale (mitochondries sous forme fragmentées, augmentation de la fission), (2) des lésions de l'ADN nucléaire et une fragmentation des protéines du cytosquelette et (3) une dépolarisation mitochondriale et à l'apoptose (Song et al., 2015) et (Mallick et al., 2015)

D. Relations mitochondrie et cancer

a. Métabolisme mitochondrial et résistance aux traitements thérapeutiques

En présence d'oxygène, les cellules « saines » produisent leur ATP majoritairement à partir de la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Suite à l'entrée de glucose dans la cellule, celui-ci est dégradé au cours de la glycolyse puis le pyruvate obtenu est utilisé par la mitochondrie pour synthétiser de l'ATP. On dit que ces cellules possèdent alors un « métabolisme mitochondrial ».

Généralement, la cellule cancéreuse présente une reprogrammation métabolique se traduisant par une augmentation de la consommation de glucose associée à une plus grande quantité de lactate produit. On parle alors de « métabolisme glycolytique » ou de « glycolyse aérobie ». Le phénotype « glycolytique » est caractérisé par une augmentation de l'expression de transporteurs d'import au glucose au niveau de la membrane plasmique (en particulier GLUT1) ainsi qu'une augmentation des enzymes de la glycolyse telles que l'hexokinase 2 (responsable de la conversion du glucose en glucose-6-phosphate) et la lactate déshydrogénase-A (responsable de la conversion du pyruvate en lactate). L'augmentation de la glycolyse aérobie permet de fournir aux cellules cancéreuses les précurseurs de nucléotides, de lipides et de protéines nécessaire à leurs besoins suite à l'augmentation de l'import de leurs nutriments (acides aminés, lipides), mais assure aussi la production d'ATP. La glycolyse nécessite notamment du NAD⁺ qui est normalement généré par le complexe I mitochondrial. Faute de l'utilisation de l'OXPHOS, le NAD⁺ est généré lors de la réduction du pyruvate en lactate.

Cette flexibilité métabolique (OXPHOS vers glycolyse) est plus connu sous le nom d'effet « Warburg » (Warburg, 1956b) et (Warburg, 1956a). Cependant, contrairement cette l'hypothèse initiale, les cellules cancéreuses ne présentent pas systématiquement des altérations mitochondriales (fonctionnement et activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ou de l'ATP synthase, diminution du contenu en l'ATP mitochondrial produit). Certaines cellules cancéreuses possèdent des mitochondries fonctionnelles capables de synthétiser de l'ATP aussi efficacement que les mitochondries des cellules « saines » (Moreno-Sánchez et al., 2007). Par conséquent, il existe donc différents types de phénotype métabolique en fonction de la cellule cancéreuse considérée. Le chapitre suivant est basé sur différentes études portant sur la reprogrammation du métabolisme, la production d'énergie et enfin sur les changements retrouvés au sein de la chaîne respiratoire mitochondrial. **Tout ceci dans le contexte de la résistance des cellules aux thérapies.**

• <u>Reprogrammation générale du métabolisme :</u>

La « reprogrammation » métabolique (OXPHOS vers glycolyse) a notamment été retrouvée entre des cellules leucémiques sensibles et résistantes à l'imatinib (inhibiteur de l'activité tyrosine-kinase du récepteur Bcr-abl) (Kluza et al., 2011). Les cellules résistantes possédaient notamment des mitochondries plus petites, un potentiel de membrane plus faible et une diminution de la consommation d'oxygène mitochondriale à l'état de routine et de gaspillage énergétique. De plus, une accumulation de certains intermédiaires du cycle de Krebs a pu être observée (succinate, fumarate, malate) dans les mitochondries de ces cellules résistantes. Dans ces cellules résistantes, l'altération du métabolisme mitochondrial est compensée par une augmentation de la « glycolyse aérobie ». Cette étude a permis de démontrer dans ce modèle cellulaire, que le métabolisme glycolytique été associé à la résistance à l'imatinib (Kluza et al., 2011).

Il semble que l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses résistantes dépende de leur environnement. Ceci a été démontrée dans des cellules leucémiques résistantes au cisplatine (sel de platine) présentant un métabolisme glycolytique (Harper et al., 2002). Dans les conditions où le glucose est présent en quantité suffisante, la glycolyse est majoritairement utilisée pour fournir l'énergie aux cellules. En revanche, dans un environnement pauvre en glucose, ces cellules sont capables de synthétiser leur énergie à partir des lipides. Cette capacité à utiliser la β -oxydation comme source d'énergie montre que les mitochondries de ces cellules sont toujours fonctionnelles (Harper et al., 2002).

Ainsi, les cellules résistantes peuvent présenter une capacité d'adaptation métabolique en fonction de l'environnement. Cette flexibilité métabolique est essentielle pour la survie, la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses.

• <u>Production d'énergie et enzymes impliquées dans cette production :</u>

En réponse à un stress chimiothérapeutique, les cellules cancéreuses ont besoin d'une quantité d'ATP suffisante afin de répondre par exemple, à l'augmentation de l'activité des pompes d'efflux des drogues (quand elles sont présentes) ou encore d'activer les voies de

- 71 -

signalisation de la survie cellulaire (PI3K/Akt/mTOR et Ras/Raf/MEK/ERK). Plusieurs études ont donc étudié le rôle de l'ATP intracellulaire dans la résistance des cellules cancéreuses aux traitements.

Une augmentation du contenu en ATP intracellulaire serait associée à une résistance des cellules comme démontré dans des cellules cancéreuses du côlon et des cellules d'adénocarcinome ovarien résistantes aux sels de platine (Zhou et al., 2012) et (Schneider et al., 2013). De manière intéressante, dans la première étude, l'utilisation de liposomes contenant de l'ATP, sur les cellules parentales sensibles, entraine une augmentation de leur résistance. Ce résultat a permis d'établir un lien direct entre le contenu en ATP intracellulaire et la résistance observée dans ces cellules (Zhou et al., 2012). Dans le second cas, l'augmentation de l'ATP était probablement liée à une augmentation de la synthèse d'ATP mitochondriale (Schneider et al., 2013).

L'hexokinase est une enzyme particulièrement impliquée dans la production d'ATP par la glycolyse. L'augmentation de son expression dans des cellules cancéreuses ovariennes serait associée à l'apparition d'une résistance au cisplatine (Wintzell et al., 2012). Cette résistance serait potentiellement due à une augmentation de l'ATP intracellulaire (non démontrée dans l'étude).

Cependant, une étude montre que la diminution de l'expression et de l'activité de l'ATP synthase est associée à la résistance des cellules cancéreuses colorectales au 5-fluorouracile (analogue pyrimidique) (Shin et al., 2005). L'inhibition de l'ATP synthase par l'oligomycine conduit à une augmentation de la viabilité dans ces cellules. De plus, l'utilisation d'un siARN dans les cellules sensibles conduit à une augmentation de leur résistance (Shin et al., 2005). Cette étude démontre qu'une diminution de l'expression de l'ATP synthase conduit à une augmentation de la résistance au 5-fluorouracile et indique qu'une inhibition de l'ATP mitochondrial n'est pas suffisante pour sensibiliser les cellules cancéreuses au 5-fluorouracile.

Différents inhibiteurs du métabolisme énergétique ont été utilisés afin de cibler les cellules cancéreuses.

Le 3-bromopyruvate (inhibiteur de l'hexokinase 2) bloque la transformation du glucose en glucose-6-phosphate. L'utilisation de cet inhibiteur dans des cellules cancéreuses leucémiques résistantes possédant un phénotype « glycolytique » entraine une diminution importante du taux d'ATP intracellulaire. L'inhibition de la glycolyse conduit à une diminution de la résistance qui serait due à une déphosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad (Xu et al., 2005).

Lonadimine, un autre inhibiteur de l'hexokinase 2, en diminuant l'ATP intracellulaire dans des cellules cancéreuses du côlon ou dans des cellules cancéreuses mammaires résistantes à la doxorubicine, diminue l'activité de la P-gp (pompe d'efflux ATP-dépendante). Une augmentation de l'accumulation est observée ayant pour conséquence une diminution de la résistance de ces cellules (Fanciulli et al., 2000) et (Floridi et al., 1998).

Enfin, l'utilisation d'un milieu appauvri en glucose associé à un inhibiteur du complexe I semble être une approche intéressante afin de diminuer la résistance des cellules cancéreuses (Palorini et al., 2013). Dans un modèle de cellules cancéreuses mammaires, MDA-MB-231, dont le métabolisme est décrit pour être glycolytique l'utilisation de cette approche conduit à une diminution de la production d'énergie par la glycolyse mais aussi par la mitochondrie pouvant entrainer une diminution de la résistance des cellules cancéreuses (Palorini et al., 2013).

• Changements au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale :

D'autres études ont porté plus spécifiquement sur les changements retrouvés au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale dans des cellules sensibles ou résistantes à des traitements anticancéreux.

Ainsi, dans les cellules du côlon, HT-29, résistantes au 5-fluorouracile, il apparait que l'OXPHOS est utilisée comme source d'énergie principale. Cette observation traduisant la fonctionnalité des mitochondries de ces cellules (Corti et al., 2015). D'autre part, l'inhibition des différents complexes respiratoires mitochondriaux dans ces cellules s'accompagne d'une diminution de leur résistance (Corti et al., 2015).

L'étude protéomique de tissus de patients atteints d'un adénocarcinome œsophagien a permis d'établir une association positive entre la réponse au cisplatine et un défaut la chaîne respiratoire mitochondriale, causé par une diminution de l'expression du complexe IV (Aichler et al., 2013). Cette association a été vérifiée grâce à l'utilisation d'un siARN ciblant le complexe IV qui augmente la sensibilité de ces cellules au cisplatine. Au sein des mitochondries l'invalidation de ce complexe entraine un gonflement mitochondrial, une perte des crêtes mitochondriales, une diminution de la consommation d'oxygène et de la production d'ATP (Aichler et al., 2013).
Dans une autre étude, la résistance des cellules de gliomes au témozolomide (agent alkylant) est associée à un remodelage complet de la chaîne respiratoire (Oliva et al., 2010) et (Oliva et al., 2011). Ce remodelage est caractérisé par une diminution des activités des complexes I et de l'ATP synthase et une augmentation des activités des complexes II, III et IV. Ces changements de l'activité des complexes pourraient permettre une diminution de la production d'ERO et participer à la résistance (Oliva et al., 2010) et (Oliva et al., 2011).

b. Stress oxydant et résistance aux traitements thérapeutiques

i. UCP, Sirtuine 3 et stress oxydant mitochondrial

Comme décrit précédemment, la mitochondrie est une source de production d'ERO (Chapitre I – partie A). Une production modérée d'ERO dans les cellules stimule la croissance et la prolifération cellulaire alors qu'une production soutenue d'ERO peut conduire à la mort cellulaire via l'induction de dommages à l'ADN, aux protéines ou encore aux lipides (Behrend et al., 2003) et (Ott et al., 2007). Ainsi dans un modèle cellulaire de lymphome résistant au stress oxydant (sélection après des doses croissantes de peroxyde d'hydrogène), des changements mitochondriaux sont observés en réponse au stress oxydant : diminution de la libération du cytochrome c et de la protéine Smac/DIABLO (protéine mitochondriale proapoptotique) ainsi qu'une diminution de la peroxydation des CL (Wilkinson et al., 2012).

Bien que son rôle dans le découplage soit incertain, l'UCP2 pourrait participer à la régulation de la production d'ERO. Dans des cellules cancéreuses du colon, une surexpression de cette protéine s'accompagne d'une diminution de la production d'ERO en réponse aux traitements chimiothérapeutiques (Derdak et al., 2008). Dans ces cellules, cette surexpression d'UCP2 conduit à une protection contre l'apoptose induite par un inhibiteur de la topoisomérase I (camptothecin) et par des inhibiteurs de la topoisomérase II (doxorubicine et etoposide) et semble être associée à une diminution de la production d'ERO intracellulaire (Derdak et al., 2008). Cette implication de la surexpression d'UCP2 dans la résistance aux traitements thérapeutiques a aussi été démontrée dans un modèle de xénogreffe sur souris nude surexprimant la protéine UCP2 (Derdak et al., 2008).

Une autre étude a permis de mettre en évidence le rôle protecteur de cette protéine. Dans un modèle cellulaire issu d'un adénorcarcinome du pancréas, l'utilisation du TTNPB (analogue du rétinol – active le retour des H⁺ par l'UCP2) ou la sur-expression de la protéine UCP2 est associée à l'apparition d'une résistance au gemcitabine (analogue de la pyrimidine) suite à une diminution du stress oxydant (Dalla Pozza et al., 2012). De manière opposée, un retour de la sensibilité de ces cellules est observé suite à l'utilisation d'un inhibiteur (genipin) ou d'un siARN dirigé contre la protéine UCP2 entrainant une augmentation de la production d'ERO. Ces résultats ont permis pour la première fois, de mettre en évidence un rôle important de l'UCP2 dans la résistance au gemcitabine dans un modèle d'adénocarcinome pancréatique (Dalla Pozza et al., 2012). Cette diminution de la résistance via l'inhibition de la protéine UCP2 (via genipin ou siARN) a aussi été démontrée dans des cellules leucémiques ou des cellules cancéreuses mammaires, toutes deux présentant un phénotype MDR. Cette sensibilisation serait due à une augmentation de la production d'ERO mitochondriale engendrée par une inhibition du retour des protons dans la matrice mitochondriale suite à l'inactivation de la protéine UCP2 (Mailloux et al., 2010) et (Pons et al., 2015).

Une autre protéine mitochondriale, la sirtuine 3 (SIRT3), a été proposée comme pouvant participer à la réponse au stress oxydant. Les sirtuines sont des histones déacétylases dépendantes du NAD⁺. Une fois dans la mitochondrie, la SIRT3 permet une baisse du stress oxydant via l'activation des enzymes détoxifiantes comme la Mn-SOD. Ainsi, dans des cellules cancéreuses mammaires résistantes au tamoxifem, une surexpression de la protéine SIRT3 est observée (Zhang et al., 2013). De manière opposée, une diminution de la résistance de ces cellules est observée suite à une diminution de l'expression de la SIRT3 par un siARN qui a conduit à une augmentation de la production d'ERO (Zhang et al., 2013). Cette diminution de la SIRT3 a pu conduire à une diminution de la Mn-SOD entrainant une diminution des défenses antioxydantes capables de contrer la formation d'ERO engendrée par l'utilisation des drogues (Torrens-Mas et al., 2016).

La résistance au stress oxydant engendrée par les drogues peut aussi apparaitre suite à l'induction de la protéine Romo1 (Reactive Oxygen Species Modulator 1 – localisée au niveau mitochondrial, responsable de l'augmentation d'ERO cellulaire) par le 5-fluorouracile (Hwang et al., 2007). Cette augmentation de la production d'ERO via l'expression de la protéine Romo1 est contrée par l'augmentation de la Mn-SOD mais aussi de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans des cellules cancéreuses pulmonaires résistantes à cet agent thérapeutique (Hwang et al., 2007).

Ainsi, les mitochondries des cellules résistantes régulent leur niveau de stress oxydant, en augmentant l'expression des protéines aux propriétés antioxydantes comme l'UCP2 et la SIRT3.

ii. Défenses antioxydantes mitochondriales et résistance

Afin de contrer les effets délétères induits par les ERO, la mitochondrie contient aussi de nombreuses enzymes capables de métaboliser ces radicaux libres et de réguler le stress oxydant comme la Mn-SOD, la glutaredoxine mitochondriale (Grx2), la gluthathion peroxydase 4 (GPx4), la thioredoxine 2 (Trx2) et la peroxyrédoxine 3 (Prx3).

A un stade avancé, l'augmentation du niveau d'expression de la Mn-SOD a été rapportée pour être associé à l'agressivité des tumeurs et au développement des métastases (Tsanou et al., 2004) et (Dhar et al., 2012). L'expression de cette protéine est également associée à l'apparition d'une résistance à la doxorubicine dans des cellules cancéreuses mammaires (MDA-MB-231) ou du colon (HCT116) suite à une diminution des anions superoxydes générés par l'agent anticancéreux (Fu et al., 2016), (Kumar et al., 2014) et (Kuninaka et al., 2000). D'autre part, l'implantation de cellules MDA-MB-231 (surexprimant la Mn-SOD) dans un modèle de souris nude conduit à une augmentation des métastases (Fu et al., 2016). A l'inverse, la diminution de l'expression de cette enzyme par un siARN ou shARN dans ces cellules conduit à une diminution de leur résistance (*in vitro*) et à la capacité de former des métastases (Fu et al., 2016), (Kumar et al., 2010).

La GPx4 détoxifie le peroxyde d'hydrogène et est la seule isoforme des GPx à être capable de réduire les acides gras oxydés ou encore les hydroperoxydes de cholestérol. Il semble que le taux d'expression de cette protéine influe sur la viabilité cellulaire. Ainsi, la surexpression de cette protéine dans un modèle de souris transgéniques conduit à une diminution de l'apoptose induite par un régime riche en acides gras polyinsaturés n-3. En revanche, la délétion de la GPx4 conduit à une augmentation de l'apoptose suite à l'augmentation de la peroxydation des CL chez les animaux ayant reçu le régime riche en acides gras polyinsaturés n-3 (Fan et al., 2011). Des résultats similaires ont été observés dans des cellules cancéreuses ovariennes suite à l'utilisation d'un siARN dirigé contre la GPx4 (Ding et al., 2007).

Les peroxyrédoxines sont des enzymes mitochondriales antioxydantes capables d'induire une réduction de l'H₂O₂ en présence de thiorédoxine. Cette enzyme a été montrée comme pouvant participer à la résistance cellulaire suite à une diminution de la production

d'ERO, une diminution de la libération du cytochrome c et par conséquent de l'apoptose (Li et al., 2015).

 iii. Diminution de la résistance par l'utilisation de molécules engendrant une production d'ERO

Des molécules ciblant le métabolisme mitochondrial sont utilisées pour contrer la résistance des cellules cancéreuses via une augmentation de la production d'ERO. Ainsi, une diminution de la résistance des cellules cancéreuses mammaires à la doxorubicine est observée après l'utilisation du *pluronic* (poloxamère amphiphile) (Alakhova et al., 2010). Cette molécule conduit à une diminution de la consommation d'oxygène mitochondriale (inhibition des complexes I et IV) et à une augmentation de la production d'ERO entrainant l'apoptose des cellules (Alakhova et al., 2010). L'utilisation du dichloroacétate (favorisant l'entrée du pyruvate de la mitochondrie) conduit à une diminution de la résistance dans un modèle cellulaire d'hépatocarcinome résistant au sorafenib (inhibiteur de tyrosine-kinase) (Shen et al., 2013) et dans des cellules issues de cancer de la tête et du cou résistantes au cisplatine (Roh et al., 2015). L'utilisation de dichloroacétate stimule l'OXPHOS dans ces cellules caractérisées par un métabolisme « glycolytique ». Ceci a eu pour conséquence, une augmentation de la production d'ERO mitochondriale conduisant à la mort cellulaire (Shen et al., 2013) et (Roh et al., 2015).

La potentialisation des traitements thérapeutiques générateurs d'ERO via l'utilisation d'adjuvant a aussi été étudiée. L'utilisation de l'allicine (molécule organo-sulfurée possédant un groupement fonctionnel thiosulfinate et retrouvé dans l'ail) et de la shikonine (pigment de couleur rouge issus de *Lithospermum erythrorhizon*) montre un effet potentialisateur de la cytotoxicité du 5-fluorouracile et du cisplatine (Zou et al., 2016). Ces deux molécules augmentent la production d'ERO mitochondriale conduisant à la mort des cellules par apoptose. Ces effets sont observés dans des cellules cancéreuses hépatocellulaire résistantes au 5-fluorouracile et des cellules cancéreuses du colon résistantes au cisplatine (Zou et al., 2016).

Ainsi, une augmentation de l'expression mitochondriales de protéines capables de diminuer le stress oxydant (UCP2 et SIRT3), ou une augmentation de leurs défenses antioxydantes (Mn-SOD et Gpx4), permet aux mitochondries des cellules résistantes de s'adapter aux effets délétères des ERO engendrés par les agents thérapeutiques utilisés.

L'utilisation de molécule permettant une augmentation de la production d'ERO mitochondriale permet cependant de diminuer la résistance **Figure 20**.



Figure 20 : Mécanismes d'adaptations de la mitochondrie au stress oxydant induit par les traitements thérapeutiques.

c. Mort cellulaire et résistance aux traitements

En plus d'une adaptation métabolique mais aussi d'une adaptation au stress oxydant, les mitochondries des cellules résistantes développent une résistance à l'apoptose intrinsèque. La surexpression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-_{XL} et Mcl-1) intervenant dans cette voie de l'apoptose est un mécanisme fréquent pouvant expliquer la résistance observée dans les cellules cancéreuses et est corrélée avec un mauvais pronostic (Indran et al., 2011). Ainsi la résistance des cellules au cisplatine est corrélée avec un surexpression de la protéine Mcl-1 dans des modèles de cellules cancéreuses du poumon (Michels et al., 2014) et (Ma et al., 2016). Dans ces modèles, l'utilisation d'un inhibiteur (obatoclax) ou d'un siARN dirigé contre cette protéine conduit à une diminution de la résistance (Michels et al., 2014) et (Ma et al., 2016). Des résultats similaires ont été obtenus *in vivo*, où l'utilisation de l'obatoclax entraine une réduction de la taille des tumeurs (Michels et al., 2014).

Une « coopération » entre les protéines anti-apoptotiques Bcl-_{XL} et Mcl-1 peut apparaître afin de protéger les cellules cancéreuses résistantes de l'apoptose induite par les traitements thérapeutiques. Dans des cellules cancéreuses issues de cancer de la plèvre et résistantes au cisplatine, l'inhibition conjointe de ces deux protéines par l'utilisation de siARN entraine une diminution drastique de la viabilité cellulaire (Varin et al., 2010). Des résultats similaires sont rapportés suite à l'utilisation d'un inhibiteur de Bcl-_{XL} combiné à un siARN dirigé contre la protéine Mcl-1, dans un modèle de cellules cancéreuses ovariennes résistantes au cisplatine surexprimant la protéine Mcl-1 (Simonin et al., 2009).

Cette surexpression des protéines anti-apoptotiques permet l'inhibition des protéines pro-apoptotiques (Bax et Bak) empêchant l'apoptose suite à la formation du pore mitochondrial et à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (apoptose intrinsèque) (Indran et al., 2011).

D'autre part, il semble que le taux d'expression de la protéine Apaf-1 (protéine impliquée dans la formation de l'apoptosome) peut participer à la résistance des cellules cancéreuses (Soengas et al., 2001). En effet, la sous-expression de cette protéine, dans un modèle cellulaire de mélanome, est associée à une résistance à la doxorubicine. De manière inverse, un retour de la sensibilité de ces cellules est observé après une augmentation du taux de cette protéine via une transfection génique (Soengas et al., 2001). Dans un autre modèle cellulaire (cancer de l'ovaire), la diminution de l'activité de la protéine Apaf1 est associée à la résistance de ces cellules au cisplatine (Liu et al., 2002).

Durant l'apoptose intrinsèque la protéine mitochondriale pro-apoptotique Smac/DIABLO (activateur secondaire des caspases) est relarguée dans le cytosol. Le taux d'expression de cette protéine semble être corrélé à la réponse thérapeutique. En effet, sa faible expression est retrouvée chez des patients non répondeurs à la chimiothérapie (Xu et al., 2011). Dans un modèle de cellule cancéreuse de l'œsophage, l'invalidation de cette protéine augmente la résistance des cellules à différents agents thérapeutiques (cisplatine, 5-fluorouracile et paclitaxel). Cette augmentation de la résistance est due à une diminution du relargage du cytochrome c et à une diminution de l'activation de la caspase 9 (Xu et al., 2011). L'implication de cette protéine dans la résistance aux traitements a aussi été mise en évidence dans un modèle animal KO présentant une résistance au cisplatine (Xu et al., 2011).

Un lien entre l'ouverture du mPTP induite par les ERO et la résistance a aussi été rapporté. L'inhibition de la production d'ERO par le complexe I, par la sérine protéase SERPINB3, entraine un retard d'ouverture du mPTP et ainsi participe à la résistance des cellules cancéreuses hépatiques à différentes molécules thérapeutiques (Ciscato et al., 2014).

En réponse à un stress généré par les traitements thérapeutiques, l'autophagie peut-être une voie de survie permettant d'échapper à la mort cellulaire. Ce processus est en effet décrit pour être impliqué dans la résistance aux agents anticancéreux (Sui et al., 2013). Ainsi l'augmentation de l'autophagie est associée à la résistance des cellules cancéreuses pulmonaires résistantes à l'étoposide en association au cisplatine (Pan et al., 2014). Une diminution de la résistance de ces cellules est observée suite à une diminution de l'autophagie grâce à l'utilisation d'un micro ARN miR-24-3p ciblant la protéine Atg4 (nécessaire à la formation du phagosome) (Pan et al., 2014). D'autre part, le niveau d'expression du récepteur mitochondrial BNIP3, facteur déclencheur de la mitophagie, semble plutôt être impliqué dans une augmentation de la sensibilité des cellules. Ainsi, un fort niveau d'expression de cette protéine dans des cellules cancéreuses colorectales, est associée à une sensibilité au cisplatine (Zacal et al., 2005). Des résultats similaires sont rapportés dans un modèle de cellules cancéreuses pancréatiques, où l'augmentation de l'expression de BNIP3 est associée à une augmentation de leur sensibilité au gemcitabine (Ishida et al., 2007). A l'inverse, un faible niveau d'expression de BNIP3 (diminution de la mitophagie) permet une augmentation de la résistance au gemcitabine dans un modèle de cellules cancéreuses ovariennes (Akada et al., 2005)

En conclusion, contrairement à l'idée émise par O.Warburg, la mitochondrie des cellules résistantes n'est pas forcement dysfonctionnelle et participe à la résistance de ces cellules. Cet organite a réussi à s'adapter à l'environnement délétère induit par les traitements thérapeutiques en adaptant :

• son métabolisme oxydatif : réarrangement des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale

• son niveau de stress oxydant : surexpression des protéines UCP2 et SIRT3 ou surexpression des défenses antioxydantes Mn-SOD et GPx4

• son rôle dans la mort cellulaire : diminution du déclenchement de l'apoptose intrinsèque via une surexpression de protéines anti-apoptotiques ou diminution de la dégradation des mitochondries par la mitophagie.

d. Pompes d'efflux et résistance aux traitements

L'un des mécanismes cellulaires pouvant intervenir dans la résistance aux traitements thérapeutiques et participer au phénotype MDR est la présence de pompe d'efflux des drogues au niveau de la membrane plasmique. Ces pompes font partie de la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et effluent les agents anticancéreux via une hydrolyse de l'ATP, limitant ainsi l'accumulation et la cytotoxicité des molécules thérapeutiques utilisées.

Tous les transporteurs ABC possèdent une organisation commune composée :

• de domaines NBD (Nucleotide Binding Domain) : situé du côté cytoplasmique, ces domaines permettent l'hydrolyse de l'ATP nécessaire au fonctionnement de ces pompes

• de domaines TMD (TransMembrane Domain) : ces domaines transmembranaires, composés de six hélices α , permettent la fixation du substrat à effluer et fixent la spécificité des transporteurs

L'expulsion des molécules par ces différents transporteurs peut se realiser selon deux mécanismes :

• Un modèle dit de « l'ATP switch » **Figure 21** : Dans ce modèle, la fixation du substrat au niveau des domaines TMD entraine un changement de configuration des domaines NBD (formation de dimère), permettant ainsi la fixation de l'ATP. Cette fixation va alors entrainer un changement de conformation des domaines TMD permettant l'expulsion du substrat. L'hydrolyse de l'ATP par les domaines NBD entraine leur dissociation. Le relargage de l'ADP et du phosphate inorganique permet ensuite un retour de la pompe dans sa configuration initiale afin d'entamer un nouveau cycle de transport (Linton et al., 2007).



Figure 21 : modèle d'expulsion dit de « l'ATP switch ». Modifié d'après (Linton & Higgins, 2007)

• Le modèle dit « Reciprocating twin-channel » : dans ce modèle l'hydrolyse de l'ATP est réalisée de manière alternée entre les domaines NBD. La première molécule de substrat se lie à un premier TMD et est expulsée suite à l'hydrolyse d'une première molécule d'ATP grâce à un premier domaine NBD. Une deuxième molécule peut alors venir se fixer sur le deuxième TMD grâce à la stabilisation de ce domaine par l'ADP et le phosphate inorganique formés lors de la première expulsion (Jones et al., 2014).

i. Le transporteur P-glycoprotéine

La P-glycoprotéine (P-gp ou ABCB1 ou MDR1) a été découverte en 1976 par l'équipe de Ling et al. dans des cellules tumorales sélectionnées avec de la daunorubicine. La résistance de ces cellules est due à la présence dans leur membrane plasmique d'une glycoprotéine de 170 kDa (Jones et al., 2014). Cette protéine est composée d'une seule chaine portant deux domaines TMD homologues composés chacun de 6 hélices α transmembranaires et deux domaines NBD homologues **Figure 22**.



Figure 22 : Structure de la P-glycoprotéine. Modifié d'après (Sharom et al., 2011)

La P-gp peut interagir avec de nombreux composés de nature différente qui sont de manière générale hydrophobes et faiblement amphiphiles et d'un poids moléculaire pouvant aller de 80 à 1000 kDa. Le tableau ci-dessous présente une partie des substrats de la P-gp **Tableau 3**. Ce transport inclut des molécules de type anthracyclines, vinca alkaloïdes (ciblage des microtubules) mais aussi des modulateurs qui peuvent bloquer la fonction de transporteur de cette pompe (vérapamil, cyclosporine A).

Le cycle de transport au sein de la P-gp se fait selon un modèle d' « ATP switch » (Sharom et al., 2011).

Tableau 3 : Substrats de la P-gp

Modifié d'après (Chen et al., 2015)

Anthracyclines	Doxorubicine, Daunorubicine, Epirubicine
Taxanes	Paclitaxel, Docetaxel
Vinca alkaloïdes	Vinblastine, Vincristine
Inhibiteurs des Tyrosine Kinase	Imatinib, Gefitinb
Produits Naturels	Flavonoïdes, Curcumonoïdes
Fluorophores	Rhodamine 123, Hoechst 33342, Calceine
Bloqueurs de la fonction transporteur	Verapamil, Cyclosporine A

Ce transporteur est surtout retrouvé localisé au niveau apical des cellules composant les organes de détoxification de l'organisme comme l'intestin, le foie, les reins (Kathawala et al., 2015). Ce transporteur possède différentes fonctions au sein de l'organisme : au niveau intestinal il permet l'extrusion des molécules de la lumière intestinale et une réduction de leur absorption, il peut aussi jouer le rôle de flippase pour les molécules lipophiles (phospholipides) en permettant leur transport du cytoplasme au feuillet externe de la membrane (Sharom et al., 2011).

Localisation mitochondriale :

L'étude de Munteanu et al. a mis en évidence une localisation mitochondriale de la P-gp dans des cellules leucémiques résistantes (K-562) à la doxorubicine (Munteanu et al., 2006). Grâce aux techniques de cytométrie en flux et de microscopie confocale, la P-gp apparait fortement exprimée au niveau de la membrane plasmique des cellules résistantes. L'expression de ce transporteur est aussi retrouvée dans la mitochondrie et représenterait environ 20% de l'expression cellulaire totale. Afin de vérifier sa fonctionnalité, cette équipe a réalisée des expériences d'accumulation de la drogue directement sur mitochondries isolées. Une plus forte accumulation dans les mitochondries issues de cellules résistantes est observée par rapport aux mitochondries issues de cellules sensibles. Dans ces cellules, la P-gp mitochondriale fonctionne dans le sens inverse (pompe d'influx mitochondriale - transport du cytosol vers le compartiment mitochondrial), entrainant une accumulation au niveau mitochondrial. La finalité de cette

accumulation intramitochondriale serait de protéger le noyau des dommages engendrés par la doxorubicine (Munteanu et al., 2006).

Une deuxième étude, réalisée sur cellules issues d'un hépatocarcinome et résistantes à la doxorubicine a également démontré la présence de ce transporteur au niveau de la mitochondrie (Solazzo et al., 2006). En revanche dans ce cas, la P-gp mitochondriale fonctionnait dans le même sens que la P-gp plasmique (pompe d'efflux – transport de la mitochondrie ver le cytosol). Ce résultat suggère que dans ces cellules résistantes, l'expression de la P-gp mitochondriale permettrait de préserver la mitochondrie des effets délétères de l'agent thérapeutique (Solazzo et al., 2006).

Cependant la localisation mitochondriale de la P-gp est discutée. En effet, l'équipe de Paterson et al. a démontré que la P-gp n'était pas présente au niveau des membranes mitochondriales. Pour cette équipe, les résultats obtenus par la technique de Western-blot (confirmation de la protéine au niveau mitochondrial), dans les études de Munteanu et al. et Solazzo et al. seraient liées à une mauvaise méthode de purification des mitochondries (contamination par la membrane plasmique) (Paterson et al., 2007).

ii. Le transporteur Multidrug Resistance-associated Protein 1

Le transporteur Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1 ou ABCC1) a été découvert dans des cellules cancéreuses du poumon H69AR résistantes à la doxorubicine (Mirski et al., 1987). Cette protéine de 190 kDa possède une structure composée de trois domaines TMD et de deux domaines NBD **Figure 23**.





Tout comme la P-gp, le transporteur MRP1 possède de nombreux substrats pouvant être des agents anticancéreux, des antiviraux, des antibiotiques. Le cycle de transport de cette protéine semblerait se dérouler comme le modèle de « l'ATP switch » où la fixation du substrat se ferait à l'aide du GSH (Schneider et al., 1995) et (Deeley et al., 2006).

Ce transporteur présente une distribution variable au sein de l'organisme avec une forte expression au niveau des poumons, des reins ou encore du muscle cardiaque (Deeley et al., 2006). Dans ces organes, ce transporteur est souvent localisé au niveau de la membrane plasmique et permet le transport des composés situés au niveau basolatéral des cellules, contrairement aux transporteurs P-gp et BCRP retrouvés au niveau apical.

Des études épidémiologiques ont montré une corrélation positive entre la présence de ce transporteur et une rechute plus précoce après chimiothérapie dans le cadre d'un cancer du sein. Par conséquent, la présence du transport MRP1 au niveau des cellules cancéreuses est un marqueur négatif du prognostic (Deeley et al., 2006).

• Localisation mitochondriale :

Le transporteur MRP1 a été retrouvé, dans les cellules cancéreuses, au niveau de nombreux compartiments intracellulaires comme le noyau, l'appareil de Golgi ou encore les lysosomes. Celui-ci a aussi été localisé dans les mitochondries cardiaques de souris atteintes d'un myélome et traitées par la doxorubicine (Jungsuwadee et al., 2009). L'expression de MRP1 permettrait d'augmenter l'efflux de cette molécule en dehors des mitochondries afin de lutter contre ses effets délétères sur cet organite.

Une seule étude met en évidence la localisation mitochondriale de ce transporteur dans les cellules normales ou cancéreuses provenant de divers types de cancer (Roundhill et al., 2012). MRP1 est retrouvée exprimée au niveau plasmique dans toutes les lignées étudiées mais au niveau mitochondrial seulement dans les cellules cancéreuses. Ce transporteur fonctionnerait comme une pompe d'efflux au niveau mitochondrial (Roundhill et al., 2012). L'exposition de cellules cancéreuses issues de sarcome à des doses toxiques de doxorubicine augmente l'expression de ce transporteur au niveau de leur membrane plasmique mais aussi au niveau de leur mitochondrie et est associée à l'apparition d'un phénomène de résistance (Roundhill et al., 2012).

Ces deux études ont pu démontrer que l'exposition chronique à la doxorubicine entrainait une augmentation de l'expression du transporteur MRP1 au niveau mitochondrial.

iii. Le transporteur Breast Cancer Resistance Protein

La pompe d'efflux Breast Cancer Resistance Protein (BCRP ou ABCG2 ou MXR) est composée de 655 acides aminés, possède une taille de 72 kDa. Elle est considérée comme « un demi-transporteur », car elle n'est composée que d'un domaine NBD et d'un domaine TMD **Figure 24**. Elle a été décrite en 1998 par Doyle et al. dans des cellules cancéreuses mammaires Mcf-7 exposées à un cotraitement doxorubicine et vérapamil (inhibiteur de la P-gp) (Doyle et al., 1998).



Figure 24 : Structure du transporteur BCRP. Modifié d'après (Choudhuri & Klaassen, 2006)

Le transporteur BCRP peut effluer un grand nombre de molécule Tableau 4.

Tableau 4 : Substrats du transporteur BCRP

Modifié d'après (Choudhuri & Klaassen, 2006)

Agents anticancéreux	Anthracyclines, Inhibiteurs de tyrosine kinase, anthracènes
Composés naturels	Flavonoïdes, Porphyrines
Fluorophores	Rhodamine 123, Hoechst 33342

Ce transporteur est retrouvé au niveau apical de nombreux tissus comme l'intestin grêle, le colon ou encore la glande mammaire.

Localisation mitochondriale :

Comme pour les deux autres transporteurs, très peu d'études sur la localisation mitochondriale de la pompe BCRP sont disponibles. Une première étude a permis de démontrer la localisation mitochondriale de ce transporteur dans de nombreuses cellules résistantes à la doxorubicine (cellules issues d'hépatocarcinome cellulaire, de carcinome ovarien et de cellules rénales) (Solazzo et al., 2009). La technique de microscopie électronique a permis de localiser ce transporteur au niveau des crêtes mitochondriales. L'accumulation de drogue était plus importante dans les mitochondries issues des cellules parentales sensibles que dans les mitochondries issues des cellules résistantes et exprimant le transporteur BCRP. Ce transporteur fonctionnerait comme une pompe d'efflux en diminuant l'accumulation de mitoxanthrone dans les mitochondries des cellules résistantes. Selon les auteurs, la présence du transporteur BCRP dans les mitochondries des cellules résistantes permettrait une protection de l'ADN mitochondrial contre les drogues (Solazzo et al., 2009).

Une seconde étude a permis de démontrer l'implication de ce transporteur dans la résistance de diverses cellules cancéreuses (adénocarcinome pulmonaire, cancer rénal, cancer colorectal). La BCRP retrouvée au niveau mitochondrial serait impliquée dans le relargage de la protoporphyrine IX (molécule photosensibilissante utilisée dans la thérapie photodynamique) dans ces cellules résistantes (Kobuchi et al., 2012).

iv. Inhibiteurs des transporteurs ABC

Les inhibiteurs ou modulateurs de ces transporteurs sont généralement divisés en trois groupes (Li et al., 2016) :

• <u>Inhibiteurs de première génération</u> : ces molécules présentent une faible réponse thérapeutique accompagnée d'une forte cytotoxicité (Vérapamil, cyclosporine A).

• <u>Inhibiteurs de seconde génération</u> : ces composés ont été conçus à partir de la structure des composés de première génération qui a été modifiée pour augmenter la puissance thérapeutique, la spécificité et diminuer la toxicité cellulaire (Valspodar, PSC833). Le problème de ces composés est leur interaction avec le cytochrome p450 qui peut entrainer des interactions médicamenteuses.

• <u>Inhibiteurs de troisième génération</u> : cette génération de molécules inhibitrices peuvent inverser le phénotype MDR à des concentrations du nM avec presque aucune interaction médicamenteuse. Certains de ces composés ont pu être testés en essai clinique comme le mitotane (NSC-38721) dans le cadre de cancer corticosurrénalien. Ces dernières années plusieurs études ont démontrés que les transporteurs ABC pouvaient être inhibés par d'autres molécules de types : inhibiteurs de tyrosine kinase (imatinib, nilotinib, icotinib, gefitinib, telatinib), composés naturels (polyphénols, terpenoïdes, alcaloïdes). Ces molécules sont structurellement et mécanistiquement indépendantes des composés issus des trois premières générations d'inhibiteurs (Kathawala et al., 2015) et (Chen et al., 2015) et (W. Li et al., 2016).

En conclusion, les différentes études portant sur la localisation intracellulaire de ces transporteurs ABC ont permis de mettre en évidence leur présence dans les mitochondries :

• Transporteur P-gp: mitochondries de cellules cancéreuses leucémiques résistantes à la doxorubicine (Munteanu et al., 2006), mitochondries d'hepatocarcinome résistant à la doxorubicine (Solazzo et al., 2006). Cependant cette localisation reste controversée (Paterson et al., 2007).

• Transporteur MRP-1 : mitochondries de cellules cancéreuses de divers types et cellules souches (Roundhill et al., 2012).

• Transporteur BCRP : mitochondries de cellules d'hepatocarcinome, carcinome ovarien résistantes à la doxorubicine (Solazzo et al., 2009) et mitochondries d'adénocarcinome pulmonaire, de cancer du rein ou du colon résistant au traitement photodynamique (Kobuchi et al., 2012).

Ces différentes pompes pourraient permettre un efflux des drogues hors de la mitochondrie sauf dans l'étude de Munteanu et al. où la P-gp qui fonctionnerait comme une pompe d'influx.

E. AGPI n-3, chimiosensibilisation et mitochondries

La synthèse des AGPI n-3 se fait à partir de l'acide alpha-linolénique (ALA, formule : 18 :3n-3) apporté notamment par l'alimentation dans les huiles végétales (lin, noix, colza), par les noix, par les céréales et en plus faible quantité par légumineuses. L'ALA est converti en acide eicosapentaénoïque (EPA, 20 :5n-3) et en acide docosahexaénoïque (DHA, 22 :6n-3) via des réactions d'élongations et de désaturations **Figure 25**. Le DHA et l'EPA peuvent aussi être apportés par divers produits de la mer comme les poissons gras (saumon, thon, hareng) ou les huiles de poissons.



Source : (Rohrbach et al., 2009)

Un rôle bénéfique des acides gras polyinsaturés à longues chaînes appartenant à la famille des omégas-3 (AGPI n-3) dans la prévention et le traitement des cancers a été rapporté dans de nombreuses études scientifiques (Bougnouxet al., 2010)

• <u>AGPI n-3 et prévention</u> :

L'étude du profil lipidique en acides gras du tissu adipeux mammaires (ou lipidome) a été réalisé au laboratoire. Elle a permis de démontrer qu'un profil lipidique du tissu adipeux contenant peu d'acide linoléique (18 :2n-6), un faible ratio n-6/n-3 et un fort taux d'acides gras

mono-insaturés est associé à une augmentation du risque de cancer du sein (Bougnoux et al., 2006). Une étude par méta-analyse a permis de mettre en évidence un effet protecteur de la consommation d'AGPI n-3 sur le risque de développement d'un cancer du sein (Zheng et al., 2013). L'étude VITAL (étude épidémiologique réalisée sur des femmes post-ménopausées 50-76 ans) a montré une association entre la réduction du risque de cancer du sein et la consommation en AGPI n-3 (Sczaniecka et al., 2012). Plus récemment, une étude de type cas/témoin réalisée sur 3 000 femmes a permis de mettre en évidence qu'une forte consommation d'AGPI n-6 en association avec une faible consommation d'AGPI n-3 augmentait le risque de cancer mammaire (Khankari et al., 2015).

• AGPI n-3 et traitement du cancer du sein :

Une supplémentation en AGPI peut moduler les propriétés des cellules cancéreuses (prolifération, apoptose, inflammation, migration et invasion) et influencer de manière positive la réponse aux traitements thérapeutiques (Bougnoux et al., 2009) et (D'Eliseo et al., 2016). Les mécanismes potentiels par lesquels les AGPI n-3 médient leurs effets sont (Liu et al., 2014) :

- Effet sur la composition des phospholipides des membranes plasmiques : l'incorporation de ces lipides dans les membranes peut affecter la fluidité et la perméabilité des membranes et avoir des effets potentiels sur les voies de signalisation cellulaire (Chauvin et al., 2016)
- Inhibition de la biosynthèse des eïcosanoïdes (dérivés des acides gras)
- Effet sur l'expression génique des facteurs de transcription et sur la transduction du signal via des récepteurs intracellulaires (PPARs) ou des récepteurs présents à la surface des cellules (EGFR, HER2) (Wannous et al., 2013)
- Effet lié à la peroxydation lipidique

Tous ces mécanismes peuvent être interconnectés ou fonctionner de manière complémentaire.

Notre laboratoire a permis de démontrer l'implication du stress oxydant et de la peroxydation lipidique dans les effets chimiosensibilisants des AGPI n-3 lors d'un traitement par les anthracylines (Mahéo et al., 2005). Dans la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231, cet effet est augmenté en présence de molécules prooxydantes mais est diminué en présence de molécules antioxydantes (vitamine E) (Germain et al., 1998). Cet effet a aussi été rapporté dans des tumeurs mammaires chimio-induites chez l'animal (Colas et al., 2005). Des résultats similaires ont été rapportés dans une lignée cellulaire leucémique (Fahrmann et al.,

2013). Ces différentes études supportent la notion que l'augmentation de la sensibilité induite par les AGPI n-3 aux chimiothérapies par les anthracyclines fait intervenir une majoration du stress oxydant.

Des modifications du système de détoxification cellulaire des ERO pourraient être une voie par laquelle ces lipides exercent leur effet sensibilisant. En effet, *in vitro*, une diminution de l'expression de certaines enzymes antioxydantes comme la GPx4 et la SOD1 a été rapporté suite à un traitement par le DHA dans différentes lignées tumorales (Ding et al., 2007) et (Ding et al., 2004). Dans ces études, l'invalidation de ces enzymes par la technique de siARN a entrainé une augmentation de la cytotoxicité du DHA suite à une augmentation de la peroxydation lipidique. Nous avons aussi pu montrer dans notre laboratoire que le DHA entrainait une diminution de l'activité de la GPx1 (Vibet et al., 2008). Cette inhibition des enzymes détoxifiantes a aussi été démontré *in vivo* par l'utilisation de régime nutritionnel enrichi en AGPI n-3, dans des modèle de tumeurs (Hardman et al., 2001) et (Vibet et al., 2008).

• Effets des AGPI n-3 sur la mitochondrie :

Les AGPI n-3 sont également décrits pour s'incorporer dans les phospholipides des mitochondries et notamment dans les CL (Stanley et al., 2012) et (Giros et al., 2009). Cette incorporation est susceptible d'augmenter la peroxydation lipidique des CL et de modifier certaines fonctions mitochondriales comme la phosphorylation oxydative ou la mort cellulaire (Rohrbach et al., 2009).

Dans les mitochondries de cellules cancéreuses colorectales, le DHA via son incorporation dans les chaînes latérales des CL entraine une plus forte sensibilité de ces phospholipides au stress oxydant et à la peroxydation lipidique (Watkins et al., 1998). Cette étude montre une forte corrélation entre la production d'ERO et le nombre d'insaturations contenues dans les CL. Dans un modèle de souris transgéniques présentant une délétion pour les enzymes mitochondriales antioxydantes Mn-SOD et GPx4, l'apport d'un régime riche en AGPI n-3 conduit à une plus forte peroxydation des CL se répercutant par une augmentation du gaspillage énergétique mitochondrial conduisant à une augmentation de l'apoptose (Fan et al., 2011). Le DHA contribue au ralentissement de la croissance tumorale et de la survie cellulaire via une diminution du métabolisme oxydatif mitochondrial dans les cellules cancéreuses mammaires BT474. La diminution de la respiration mitochondriale liée à la synthèse d'ATP a été associée à une augmentation de la production d'ERO (Mouradian et al., 2015).

La voie intrinsèque de l'apoptose peut être induite par le DHA et l'EPA : dans des cellules cancéreuses colorectales traitées avec ces deux AGPI n-3, une réponse apoptotique est observée suite à une dépolarisation mitochondriale, un relargage du cytochrome c et de la protéine Smac/DIABLO (protéine mitochondriale pro-apoptotique) (Giros et al., 2009). *In vitro*, dans des cellules issues de sarcomes, l'EPA induit une diminution des activités enzymatiques des complexes (complexes I+III et V) interagissant avec le cytochrome c. Ces changements sont associés à une augmentation de la peroxydation lipidique conduisant à la libération du cytochrome c (Colquhoun et al., 2001). En effet, la peroxydation des CL conduit à une séparation du complexe CL-cytochrome c et permet la libération de cofacteur dans le cytosol (Kagan et al., 2005).

• Effets des AGPI n-3 en association avec des agents chimiothérapeutiques sur la mitochondrie :

Plusieurs études ont rapporté l'implication de mécanismes mitochondriaux dans les effets chimiosensibilisants des AGP I n-3 sur différents agents anticancéreux.

Un effet synergique est observé entre le DHA et le 5-fluorouracile dans un modèle de cellules cancéreuses gastriques (Gao et al., 2016). Cet effet chimiosensibilisant implique une diminution de la production d'énergie dans les cellules suite à une diminution de l'expression protéique des complexes I, II et V mitochondriaux et un arrêt du cycle cellulaire (Gao et al., 2016). Dans un modèle cellulaire de cancer du côlon (cellules HT-29), l'utilisation AGPI n-3 (EPA + DHA) augmente les effets cytotoxiques de manière synergique de plusieurs agents anticancéreux (5-FU, oxaliplatine et irinotecan). L'utilisation de ce régime entraine la mort des cellules via l'apoptose mitochondriale suite à une perte du potentiel membranaire mitochondrial et à l'activation de la caspase 9 (Granci et al., 2013). Récemment, l'utilisation de l'EPA et du DHA en combinaison avec le bortezomib (molécule inhibitrice du protéasome) a montré un effet synergique dans des cellules de myélomes. Ces AGPI n-3 augmente l'apoptose induite par cette molécule par un mécanisme impliquant la voie mitochondriale suite à une dépolarisation membranaire mitochondriale (Abdi et al., 2014). In vivo, dans un modèle de tumeurs colorectales chimio-induite, l'utilisation d'un régime « huile de poisson » en combinaison avec un régime « huile de maïs » (dans les proportions 2,5 :1) induit une diminution de la quantité des CL entrainant des altérations des activités des différents complexes respiratoires mitochondriaux, ceci pouvant faciliter l'apoptose et inhiber la croissance tumorale (Agnihotri et al., 2016).

En conclusion, les effets chimiosensibilisants des AGPI n-3 sur la mitochondrie semblent médiés par :

- Une augmentation de la voie apoptotique mitochondriale
- Une diminution de la production d'énergie mitochondriale

Ces mécanismes pouvant se faire de manière indépendante ou de manière complémentaire.

Malgré une augmentation du stress oxydant, l'implication du stress oxydant mitochondrial n'a à ce jour pas encore été clairement identifié dans l'effet chimiosensibilisant des AGPI n-3.

F. Objectifs du travail de thèse

La chimiothérapie reste un des traitements de référence dans le cancer du sein. La doxorubicine (molécule de la famille des anthracylines) est prescrite dans le cadre d'une thérapie néo-adjuvante et adjuvante dans le traitement de ce cancer. Cependant, le développement d'une résistance des cellules cancéreuses aux agents thérapeutiques peut exister ou apparaitre au cours du temps et représente une des causes de l'échec du traitement. De par ses fonctions dans la production d'énergie ou encore dans la mort cellulaire, la mitochondrie peut jouer un rôle déterminant dans la réponse aux traitements. Les cardiolipines (CL) qui sont des phospholipides spécifiquement localisés dans les membranes mitochondriales, jouent un rôle déterminant dans la régulation des fonctions mitochondriales. Leur quantité et leur composition en acides gras peuvent influer sur ces fonctions. Notre laboratoire a mis en évidence *in vitro* et *in vivo* que certains AGPI n-3, tels que le DHA, avaient la capacité de diminuer la résistance des cellules tumorales aux agents anticancéreux et que cet effet chimiosensibilisant pouvait être médié par un stress oxydant (peroxydation lipidique). D'autre part, les CL, de par leur composition (quatres chaines latérales d'acides gras), sont susceptibles d'incorporer le DHA.

Les hypothèses de ce travail de thèse étaient (1) que les fonctions mitochondriales et notamment le métabolisme énergétique mitochondrial, en lien avec le métabolisme des CL, jouent un rôle clé dans la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires à la doxorubicine et (2) que les AGPI n-3 diminuent la chimiorésistance via leur incorporation dans les CL conduisant à leur peroxydation et à la mort cellulaire.

L'objectif global de ce projet était d'analyser le rôle de la mitochondrie et des CL dans la réponse des cellules cancéreuses mammaires à la chimiothérapie (doxorubicine) et d'identifier des cibles/mécanismes mitochondriaux potentiellement impliqués dans la réponse aux anthracyclines et sensibles aux AGPI n-3.

Le premier objectif spécifique de ma thèse était de :

« Déterminer un lien entre la résistance des cellules cancéreuses mammaires à la doxorubicine et le métabolisme énergétique mitochondrial et le métabolisme des CL ».

Pour cela, nous avons utilisé deux lignées cancéreuses mammaires : une lignée résistante à la doxorubicine (MCF-7dox) et une lignée sensible (MCF-7). Nous avons caractérisé le métabolisme énergétique mitochondrial en mesurant la consommation d'oxygène mitochondriale, la synthèse d'ATP mitochondriale, l'efficacité de la synthèse d'ATP

mitochondriale ainsi que l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire. Le métabolisme glycolytique a été étudié en mesurant la consommation de glucose et la production de lactate. Nous avons déterminé la production d'ERO et l'ouverture du pore de transition de perméabilité sous le stress oxydant induit par la doxorubicine. Le profil des CL (quantité, composition en acides gras, activité et quantité des principales enzymes de la synthèse et du remodelage) a aussi été déterminé.

Cette première étude a permis de démontrer une diminution de l'activité du complexe I et une modification du métabolisme des CL en lien avec la résistance des cellules MCF-7dox. Cette étude a aussi permis de mettre en évidence une meilleure efficacité de la synthèse d'ATP mitochondriale.

Nous avons cherché à comprendre la relevance biologique de cette amélioration du rendement énergétique dans les cellules résistantes. Nous avons émis l'hypothèse que cette meilleure capacité à produire l'ATP facilitait le fonctionnement de transporteurs d'efflux ATPdépendant retrouvés dans les mitochondries de certaines cellules cancéreuses. En effet, quelques études ont rapporté la présence de différentes pompes d'efflux telles que la P-gp (P-glycoprotéine), BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) et MRP1 (Multidrug Resistanceassociated Protein) au sein des membranes mitochondriales de cellules leucémiques, d'hépatocarcinome, de carcinome ovarien et pulmonaire, d'adenocarcinome mammaire, et de glioblastome. Par conséquent, le deuxième objectif spécifique de ma thèse était de :

« Déterminer la présence et la fonctionnalité de pompes d'efflux des agents anticancéreux au niveau des mitochondries des cellules MCF-7dox et le rôle de la synthèse d'ATP mitochondriale dans leur fonctionnement ».

Pour cela, nous avons d'abord déterminé si les pompes d'efflux P-gp, BCRP et MRP1 étaient exprimées dans les mitochondries des cellules résistantes MCF-7dox par une approche microscopique (confocale et confocale multispectrale). Nous avons ensuite étudié leur activité et le rôle de la synthèse d'ATP mitochondriale en mesurant leurs liens avec l'accumulation mitochondriale de la doxorubicine.

Cette deuxième étude a permis de démontrer la présence de deux pompes d'efflux (BCRP et MRP1) au sein des mitochondries des cellules MCF-7dox possédant une activité d'efflux (mitochondries vers cytosol) en partie dépendante de la synthèse d'ATP mitochondriale.

Le troisième objectif spécifique de ma thèse était de :

« Déterminer si l'effet sensibilisant du DHA à la doxorubicine impliquait des changements de la composition et/ou de la quantité en CL et du fonctionnement mitochondrial ».

Nous avons, dans un premier vérifié si l'effet sensibilisant du DHA était médié par un stress oxydant mitochondrial par mesure de la viabilité cellulaire en présence d'un antioxydant mitochondrial. La quantité de CL et l'incorporation du DHA dans les CL ont été mesurées. L'effet du DHA sur le métabolisme énergétique cellulaire a été déterminé en mesurant la consommation d'oxygène mitochondriale, la synthèse d'ATP mitochondriale, le rendement énergétique mitochondrial ainsi que la consommation de glucose et la production de lactate dans les cellules cancéreuses mammaires (MCF-7 et MCF-7dox) traitées pendant 6 jours avec du DHA.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'implication du stress oxydant mitochondrial dans l'effet sensibilisant du DHA. Nos résultats ont aussi démontré qu'une supplémentation en DHA a conduit à une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP mitochondriale spécifiquement dans les cellules MCF-7dox. Au niveau du profil lipidique des CL, la supplémentation en DHA a conduit à une augmentation de son incorporation dans les CL du même ordre de grandeur dans les cellules MCF-7 et MCF-7dox, mais n'a pas modifié la quantité de CL contenue dans les mitochondries.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

A. Matériel biologique

a. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires ont été cultivées dans des incubateurs sous atmosphère humide, à une température de 37°C et sous 5% de concentration de dioxyde de carbone. La culture des cellules a été réalisée sous hotte à flux laminaire, en conditions stériles afin d'éviter les contaminations bactériennes.

i. Cellules mammaires cancéreuses

1. MCF-7

Les cellules MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) ont été obtenues à l'ATCC. Ces cellules ont été isolées et établies *in vitro* en 1970 à partir d'un épanchement pleural prélevé chez une patiente âgée de 69 ans atteinte d'un adénocarcinome mammaire peu agressif (Soule et al., 1973). Elles sont à un faible stade de progression tumorale et sont sensibles à la doxorubicine.

2. MCF-7dox

Les cellules MCF-7dox ont été données au laboratoire par le Dr K. COWAN de l'Institut National de Cancer, Bethesda, Maryland, USA. Elles ont été sélectionnées par exposition à des concentrations chroniques et croissantes de doxorubicine (Fairchild et al., 1987). Elles sont résistantes à la doxorubicine avec un IC50 environ 500 fois supérieur à celui des cellules MCF-7.

Ces deux lignées cancéreuses mammaires ont été cultivées en milieu DMEM 4.5 g/L de glucose (Lonza) supplémenté avec 5% de SVF (Eurobio). Les cellules MCF-7dox ont été cultivées en présence de 1 μ M de doxorubicine afin de maintenir leur résistance ; avant les expériences, elles ont été sevrées de doxorubicine durant 7 jours.

b. Traitement des cellules par le DHA

i. Effet sur la chimiosensibilité à la doxorubicine

Les cellules (MCF-7 et MCF-7dox) ont été trypsinées puis ensemencées en plaque 24 puits (bdBiosciences) à une densité de 36 000 cellules / puits dans un volume de milieu de

culture (DMEM 4.5 g/L glucose + 5% SVF) de 1 mL. Le test de chimiosensibilité a été réalisé sur 7 jours avec 3 jours de traitements par semaine (**Figure 26**). Les cellules MCF-7 ont été traitées avec 35 nM de doxorubicine et les cellules MCF-7dox avec 10 μ M de doxorubicine. Ces doses correspondent à l'IC50 de cette molécule après 7 jours de traitement. La dose de DHA qui a été utilisée (30 μ M) correspond à la dose pour laquelle l'effet chimiosensibilisant était le plus fort avec une faible toxicité (< 20%). Un aliquot différent de DHA stocké à -80°C a été utilisé pour chaque jours d'expérimentations.

ii. Effet sur le métabolisme énergétique mitochondrial

L'effet du DHA a aussi été étudié sur le métabolisme énergétique mitochondrial. Pour cela, les cellules (MCF-7 et MCF-7dox) ont été trypsinées puis ensemencées en flacons de 25 cm² (bdBiosciences) à une densité de 10 000 cellules / puits pour les cellules MCF-7 et 6 000 cellules / puits pour les cellules MCF-7 et 6 000 cellules / puits pour les cellules MCF-7 dox dans un volume de milieu de culture (DMEM 4.5 g/L glucose + 5% SVF) de 6 mL. Les cellules ont ensuite été traitées durant 7 jours avec 30 μ M de DHA, comme indiqué ci-dessous **Figure 26**, puis utilisées pour les mesures de consommation d'oxygène mitochondriale, de synthèse d'ATP mitochondriale et du rapport ATP produit / consommation d'oxygène mitochondriale.



Figure 26 : Schéma représentatif du protocole de traitement des cellules par le DHA.

c. Traitement des cellules par des inhibiteurs des complexes respiratoires mitochondriaux

i. Effet sur la chimiosensibilité à la doxorubicine

Afin d'étudier l'impact des altérations des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sur la résistance des cellules à la doxorubicine, les cellules MCF-7 ont été

traitées pendant 72 h avec deux inhibiteurs : la roténone (inhibiteur du complexe I, Sigma Aldrich) et le KCN (inhibiteur du complexe IV, Sigma Aldrich).

Les cellules ont été trypsinées puis ensemencées en plaque 24 puits à une densité 40 000 cellules / puits dans 1 mL de milieu de culture. Le lendemain les cellules ont été traitées avec soit 50 nM de roténone, soit 20 μ M de KCN ou alors une combinaison des deux (50 nM de roténone + 20 μ M de KCN). L'opération a été renouvelée tous les jours pendant 72 h.

ii. Effet sur le métabolisme énergétique mitochondrial

L'impact des altérations des complexes mitochondriaux a aussi été étudié sur le métabolisme énergétique mitochondrial. Les cellules MCF-7 ont été traitées pendant 72 h avec deux inhibiteurs : la roténone (inhibiteur du complexe I, Sigma Aldrich) et le KCN (inhibiteur du complexe IV, Sigma Aldrich).

Les cellules ont été trypsinées puis ensemencées en flacons de 25 cm² (bdBiosciences) à une densité de 10 000 cellules / cm² dans 6 mL de milieu de culture. Le lendemain les cellules ont été traitées avec soit 50 nM de roténone, soit 20 μ M de KCN ou alors une combinaison des deux (50 nM de roténone + 20 μ M de KCN). L'opération a été renouvelée tous les jours pendant 72 h.

d. Culture des cellules en hypoxie

i. Effet sur la chimiosensibilité à la doxorubicine

Pour la condition de culture sous hypoxie : les cellules MCF-7 et MCF-7dox ont été trypsinées puis ensemencées cm² à une densité de 50 000 cellules / puits dans une plaque 24 puits (bdBiosiences) avec 2 mL de milieu de culture préalablement conditionné à 1% d'oxygène. Pour la condition témoin (culture en normoxie) : les cellules MCF-7 et MCF-7dox ont été trypsinées puis ensemencées cm² à une densité de 20 000 cellules / puits dans une plaque 24 puits (bdBiosiences) avec 2 mL de milieu de culture.

ii. Effet sur le métabolisme énergétique mitochondrial

Les lignées cellulaires (MCF-7 et MCF-7dox) ont été trypsinées et ensemencées à de fortes densités cellulaire dans des flacons de 25 cm² (bdBiosciences) avec du milieu de culture préalablement conditionné (concentration d'oxygène rapportée à 1% dans le milieu) pour la culture en hypoxie (HypoxyCool, Ruskinn). Les cellules ont été mises pendant 7 jours en conditions hypoxiques (1% O₂, 5% CO₂, 60% d'humidité) (SCI-Tive, Ruskinn) et le milieu de

culture a été renouvelé tous les 3 jours. Ceci a été utilisé pour les expériences d'étude de la glycolyse « aérobie » (dosage du glucose et du lactate) ainsi que pour la mesure de la consommation d'oxygène par oxygraphie.

e. Inhibition de l'expression génique par ARN interférents de la cardiolipine synthase

L'inhibition de l'expression génique de la cardiolipine synthase (*CLS1* – enzyme de la synthèse des cardiolipines) a été étudiée sur les cellules MCF-7 par la technique de small interfering RNA (siRNA). Les siRNA vont se fixer sur l'ARNm cible qui sera ensuite clivé et dégradé, empêchant la traduction de l'ARNm en protéines.

Les cellules ont été ensemencées en plaque 6 puits (bdBioSciences) à une densité de 0,5 millions de cellules / puits dans 2 mL de milieu de culture. Le lendemain, la transfection a été réalisée en utilisant le siRNA dirigé contre la CLS1 (si*CLS1*) (sc-72929, Santa Cruz Biotechnology). Un siRNA témoin (si*CT*) (sc-37007, Santa Cruz Biotechnology) a été utilisé en parallèle. La solution de transfection a été réalisé dans de l'Optimem sans SVF (Gibco) contenant 20 pmol de si*CLS1* ou 20 pmol de si*CT* et 5 μ L de lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) qsp 500 μ L, puis rajouter dans le milieu de culture cellulaire. Le lendemain, le milieu a été changé et les cellules incubées pendant 72 h.

f. Test de viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée grâce au test à la sulforhodamine B. Il permet de mesurer indirectement la croissance cellulaire par formation d'un complexe colorimétrique (540 nm) dont l'intensité est proportionnelle au nombre de cellules présentes. La sulforhodamine B (colorant chargé négativement) est fixée par les acides aminés basiques présents dans la membrane plasmique cellulaire. Lorsque les cellules sont lysées à l'aide d'un tampon Trisbase, le colorant est dissout dans le milieu. L'utilisation d'une molécule cytotoxique, entrainant une diminution de la viabilité cellulaire, se traduira par une diminution de l'absorbance.

Le milieu de culture contenant ou non les traitements a été retiré des puits et ces derniers ont été lavés deux fois avec du PBS avec calcium et magnésium (Lonza). Les cellules ont ensuite été fixées avec 500 μ L de TCA à 50% (Acide Trichloroacétique, Sigma-Aldrich) puis incubées 1 h à 4°C. Des lavages ont été réalisés à l'eau distillée avant d'incuber les cellules avec 200 μ L de SRB (Sigma Aldrich) à 0,4% (dilué en acide acétique 1% - VWR) pendant 15 minutes sous agitation à température ambiante. L'ensemble a été rincé 3 fois à l'acide acétique à 1% puis les cellules lysées à l'aide d'1 mL de Tris Base 10 mM (ThermoFisher). Après une incubation de 20 minutes sous agitation, $2 \times 100 \mu$ L de chaque puits ont été transférés dans une plaque 96 puits. L'absorbance de chaque puits a été lue à 540 nm.

B. Etude de la glycolyse « aérobie »

La glycolyse aérobie a été étudiée par le dosage de la consommation de glucose et de la production de lactate. Ces deux mesures ont été effectuées sur le milieu de culture prélevé avant chaque mesure d'oxygraphie réalisée sur cellules entières.

a. Dosage du glucose

Le dosage du glucose a été effectué au sein du laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire du CHRU de Tours. Celui-ci est réalisé par méthode colorimétrique (kit Randox GL 2623, RandoxLaboratories) utilisant deux réactions enzymatiques couplées :

 $glucose \ oxydase$ Glucose + O₂ + H₂O \longrightarrow Acide gluconique + H₂O₂

peroxydase

 $2 H_2 O_2$ + amino 4 phénazone + phénol \longrightarrow Quinone-imine (500 nm) + 4 H₂O

Le glucose présent dans l'échantillon est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène par la glucose peroxydase. Ce dernier sert de substrat à la peroxydase dans une réaction couplée conduisant la production de quinone-imine. L'intensité de la coloration de ce produit (mesurée à 500 nm) est proportionnelle à la concentration en glucose présent dans l'échantillon. Une gamme étalon a été utilisée pour déterminer les concentrations de glucose et a été réalisée dans les mêmes conditions que le dosage des échantillons.

b. Dosage du lactate

Le dosage du lactate a aussi été effectué au sein du laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire du CHRU de Tours. La mesure du lactate est réalisée grâce à un dosage colorimétrique (kit Olympus OSR6193, Olympus life science research europa) utilisant deux réactions enzymatiques couplées : Le lactate présent dans l'échantillon est oxydé en pyruvate et peroxyde d'hydrogène via la lactate oxydase. Ce dernier sert de substrat à la peroxydase dans une réaction couplée conduisant la production d'un chromogène. L'intensité de la coloration de ce produit (mesurée à 540 nm) est proportionnelle à la concentration en lactate et a été calculée à partir d'une gamme étalon qui a été réalisée dans les mêmes conditions que pour le dosage des échantillons.

C. Etude du métabolisme mitochondrial

a. Mesure de la consommation d'oxygène

i. Principe

Les mesures de la consommation d'oxygène mitochondriale ont été réalisées par la technique d'oxygraphie. Elle permet de mesurer la quantité d'oxygène consommée par la mitochondrie en présence de divers substrats et inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'appareil utilisé était un oxygraphe Hansatech (Eurosep Instruments) ou un oxygraphe haute résolution OROBOROS Oxygraph-2k (Oroboros Instrument). Ces deux appareils sont composés d'une cuve réactionnelle thermostatée, hermétique, disposant d'une agitation magnétique et d'une électrode de type « Clark » (sensible à l'oxygène) composée d'une cathode en platine polarisée à 0,7 volts et d'une anode en argent, mises en contact par un électrolyte KCl à 3 M. Cet ensemble est isolé du milieu d'incubation par une membrane en téflon (Membrane PTFE; Eurosep Instruments ou OroborosPOS-Menbranes; Oroboros Instrument) imperméable à l'eau mais perméable à l'oxygène dissout dans le milieu de mesure. La réduction de l'oxygène au niveau de la cathode induit une modification de courant qui est directement proportionnelle à la concentration d'oxygène dissoute dans le milieu d'incubation. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Oxygraph Plus (Eurosep Instruments) ou du logiciel DatLab 5 (Oroboros Instrument). Les courbes obtenues représentent la diminution de la concentration d'oxygène dans la cuve réactionnelle au cours du temps.

Deux types de mesure ont été utilisés : cellules entières ou cellules perméabilisées.

<u>Mesure sur cellules entières</u> : Cette mesure est réalisée avec du milieu de culture sans SVF (pour éviter l'apport d'acides gras et le fonctionnement de la β -oxydation). Elle s'effectue sans ajout de substrats, les mitochondries utilisant les substrats cellulaires endogènes et ceux contenus dans le milieu de culture pour respirer **Figure 27**.



Figure 27 : Schéma « cellules entières ».

Lors de cette mesure différents états respiratoires sont mesurés Figure 29 :

L'état de routine ou état basal : consommation d'oxygène nécessaire à la synthèse d'ATP mitochondriale (fonctionnement normale de la CRM) via l'utilisation des substrats endogènes ou présents dans le milieu de culture par les cellules.

L'état non phosphorylant ou gaspillage énergétique : consommation d'oxygène en condition non phosphorylante obtenue après ajout d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase). Il correspond à la quantité d'oxygène consommée par la mitochondrie mais non utilisée pour la synthèse d'ATP.

L'état découplé ou état FCCP : consommation d'oxygène obtenue après ajout de FCCP (molécule protonophore entrainant une dissipation de la force proton motrice). Cet état correspond à la consommation d'oxygène liée à l'activité maximale de la chaîne respiratoire mitochondriale (non limitée par l'ATP synthase).

L'état résiduel : consommation d'oxygène résiduelle obtenue après ajout d'antimycine A (inhibiteur du complexe III). Cet état représente la part d'oxygène non utilisé par la mitochondrie et est soustrait aux autres consommations d'oxygène obtenues préalablement.

<u>Mesure sur cellules perméabilisées</u> : Cette mesure est réalisée dans un tampon de respiration avec ASB ne contenant pas d'AG. Elle est effectuée après perméabilisation de la membrane plasmique par la digitonine (détergent) qui va piéger le cholestérol contenu dans les

membranes. Comme les membranes mitochondriales contiennent moins de cholestérol que la membrane plasmique, leur intégrité est maintenue. Les substrats respiratoires (glutamate + malate + succinate pour les complexes I, II, III, IV, pyruvate + malate pour les complexes I, III, IV et TMPD + ascorbate pour le complexe IV) sont ajoutés de manière extemporanée, en quantité saturante, dans le milieu de mesure et sont directement accessibles aux mitochondries. Cette dernière technique permet de contrôler l'apport des substrats à la mitochondrie et par conséquent de mesure le fonctionnement intrinsèque de la CRM Figure 28.



Figure 28 : Schéma « cellules perméabilisées ».

Différents états respiratoires sont mesurés Figure 29 :

L'état 3 ou état phosphorylant : consommation d'oxygène proportionnelle à la synthèse d'ATP maximale. Cette mesure est effectuée après ajout d'ADP (1,5 mM) associée à un ou plusieurs substrats des différents complexes de la CRM.

L'état 4-oligomycine ou état non phosphorylant : consommation d'oxygène proportionelle au gaspillage énergétique (fuite de protons). Celui-ci est mesuré après ajout d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase).

L'état découplé ou état FCCP : consommation d'oxygène liée à l'activité maximale de la CRM mesuré après ajout de FCCP (molécule découplante).

L'état résiduel : consommation d'oxygène résiduelle obtenue après ajout d'antimycine A (inhibiteur du complexe III) représentant la consommation d'oxygène non mitochondriale. Cette valeur est soustraite aux consommations d'oxygène précédentes.



Figure 29 : Courbe théorique de la consommation d'oxygène mitochondriales aux différents états de fonctionnement de la chaîne respiratoire.

ii. Réactifs utilisés

Les tampons suivants ont été utilisés pour les mesures sur cellules perméabilisées. Ils étaient aliquotés et stockés à -20°C Tableau 5.

Produits utilisés	Concentration finale
Mannitol	300 mM
ксі	10 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM
MgCl ₂	5 mM
EGTA	1 mM
+/- ASB	1 mg/mL
pH = 7,4 à 37°C	

Tableau 5 : Composition du tampon de respiration avec ou sans ASB

Les réactifs et leurs concentrations utilisés pour les mesures d'oxygraphie sont détaillés en Annexe 1.

iii. Protocole sur cellules entières

Les mesures ont été réalisées à 37°C, sous agitation magnétique, dans un volume final de 2 mL de milieu de culture (DMEM) sans SVF, avec 3 millions de cellules (oxygraphe Hansatech) ou 1 million de cellules (OROBOROS oxygraph-2k).

> <u>Préparation des cellules</u>

Les cellules de chaque lignée ont été récoltées après trypsination, comptées puis centrifugées à 700 x g pendant 3 minutes. Le culot cellulaire a été mis en suspension dans 5 mL de DMEM sans SVF puis centrifugé à 800 x g pendant 2 minutes. Le culot résiduel obtenu a ensuite été repris dans 500 μ L de DMEM sans SVF (solution cellulaire utilisée pour la mesure d'oxygraphie).

Mesure de la consommation d'oxygène

Les cellules resuspendues ont été ajoutées aux 1,5 mL de DMEM sans SVF déjà présents dans la cuve de mesure. Dès l'obtention d'une pente régulière, la consommation d'oxygène à l'état de routine a été mesurée. La phosphorylation oxydative a ensuite été inhibée par l'ajout d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase – 5,25 μ g/mL final), la pente obtenue correspond à l'état de gaspillage énergétique. Puis des ajouts successifs de 2 μ L de FCCP (80 μ M) ont été effectués jusqu'à obtenir une pente maximale. Enfin 2 mM d'antimycine A ont été ajoutés pour déterminer la consommation d'oxygène non mitochondriale.

iv. Protocole sur cellules perméabilisées

Les mesures ont été réalisées à 37°C, sous agitation, dans un volume final de 2 mL de tampon de respiration sans ASB, avec 3 millions de cellules (oxygraphe Hansatech) ou 1 million de cellules (OROBOROS oxygraph-2k) préalablement perméabilisées par la digitonine.

Préparation des cellules

Les cellules de chaque lignée ont été détachées à l'aide de trypsine, comptées puis centrifugées à 700 x g pendant 3 minutes. Le culot a été mis en suspension dans 1 mL de tampon de respiration sans ASB puis la membrane plasmique a été perméabilisée par un ajout de digitonine (1mg/mL préalablement chauffer à 95°C pendant 2 min 30 sec) (8 µL/million pour les cellules MCF-7 et 10µL/million pour les cellules MCF-7dox). L'ensemble a été agité

doucement pendant 2 minutes. Puis 4 mL de tampon de respiration avec ASB ont été rajoutés (arrêt de l'action de la digitonine), l'ensemble a été centrifugé à 800 x g pendant 2 minutes. Le culot obtenu a ensuite été repris dans 500 μ L de tampon de respiration avec BSA (solution pour la mesure d'oxygraphie).

Les doses de digitonine ont été préalablement déterminées. Ceci s'effectue en mesurant la consommation d'oxygène sur cellules entières. Des doses croissantes de digitonine (1mg/mL) ont été ajoutée jusqu'à obtenir la consommation d'oxygène maximale. Pour vérifier que seule la membrane plasmique a été perméabilisée (et donc que la membrane mitochondriale externe est intacte), une solution de cytochrome c (10 μ L à 8 μ M) a ensuite été ajouté après la dernière injection de digitonine. Si la consommation d'oxygène est identique ou n'est pas augmentée de plus de 10% alors la membrane mitochondriale externe est considérée intacte. Si la membrane mitochondriale externe est considérée intacte. Si la membrane mitochondriale externe est considérée intacte dans l'espace inter membranaire est libéré dans le cytoplasme provocant un ralentissement du fonctionnement de la CRM et l'ajout en excès de cytochrome c permet à la CRM de refonctionner normalement. Ceci se traduit par une augmentation de la consommation d'oxygène.

Mesure de la consommation d'oxygène

Les cellules resuspendues dans le tampon de respiration avec ASB ont été ajoutées dans la cuve de mesure contenant au préalable 1,5 mL de tampon de respiration avec ASB et un ou plusieurs substrats des différents complexes de la CRM ainsi que du NAD⁺ (0,5 mM), de l'iodoacétate (inhibiteur de la glycéraldéhyde-3P-déshydrogénase, bloque l'apport de substrat à la mitochondrie via la glycolyse au cas où la glycolyse fonctionnerait malgré la perméabilisation de la membrane plasmique), les cellules ne sont pas totalement perméabilisées – 2 mM). Dès l'obtention d'une pente régulière, l'ADP (1,5 mM) a été ajouté et la consommation d'oxygène liée à la synthèse d'ATP a été déterminée. La phosphorylation oxydative a ensuite été inhibée par l'ajout d'oligomycine (5,25 µg/mL). Une fois la pente stabilisée, des ajouts successifs de 2 µL de FCCP ont été effectués jusqu'à obtenir une pente maximale. Enfin 2 mM d'antimycine A ont été ajoutés.

La consommation d'oxygène a été mesurée à l'aide de différents substrats faisant intervenir différents complexes de la CRM selon les protocoles suivants :

Protocole 1 : Glutamate (5 mM), Malate (5 mM) et Succinate (10 mM) sont utilisés pour ce protocole. Le glutamate et le malate seront dégradés par le cycle de Krebs et vont essentiellement fournir du NADH au complexe I. Le succinate va être oxydé en fumarate au niveau du complexe II et ainsi permettre le transfert des électrons à travers la CRM. Ce protocole permet de mesurer les différents états respiratoires via le passage des électrons au travers des complexes I+II+III+IV **Figure 30**.



Protocole 2 : Pyruvate (5 mM) et Malate (5mM) sont utilisés. Le pyruvate est transféré dans la mitochondrie via la pyruvate déshydrogénase. Celui-ci sera métabolisé dans le cycle de Krebs, ce qui permettra de fournir essentiellement du NADH au complexe I. Ce protocole permet de mesurer les différents états respiratoires via l'utilisation des complexes I+III+IV **Figure 31**.



Figure 31 : Schéma d'alimentation des complexes respiratoires mitochondriaux selon le protocole de mesure 2.

Protocole 3 : TMPD (400 μ M) est utilisé comme substrat du complexe IV. L'ascorbate (5 mM) est utilisé pour maintenir l'état oxydé du TMPD. L'antimycine A (2 mM) inhibe le complexe III. Ce protocole permet de mesurer la consommation d'oxygène aux différents états uniquement via le complexe IV **Figure 32**.


Figure 32 : Schéma d'alimentation des complexes respiratoires mitochondriaux selon le protocole de mesure

Protocole 4 : Glutamate (5 mM), Malate (5 mM) puis Succinate (10 mM) puis TMPD (400 μ M) et Ascorbate (5 mM). Ce protocole permet dans un premier de mesurer la consommation d'oxygène via les complexes I+III+IV, puis I+II+III+IV et enfin seulement celle due au fonctionnement du complexe IV (le complexe III ayant été préalablement inhibé via l'ajout d'antimycine A (2 mM).

Protocole 5 : Pyruvate (5 mM), Malate (5mM) puis Succinate (10 mM) puis TMPD (400 μ M) et Ascorbate (5 mM). Ce protocole permet de mesurer la consommation d'oxygène via le transport des électrons au sein des complexes I+III+IV, puis I+II+III+IV et enfin seulement du complexe IV (le complexe III ayant été préalablement inhibé via l'ajout d'antimycine A (2 mM).

b. Mesure de la synthèse d'ATP mitochondriale

Cette mesure a été réalisée à l'aide des divers prélèvements effectués au cours du temps lors de la mesure de la consommation d'oxygène liée à la synthèse d'ATP maximale sur cellules perméabilisées, nous permettant d'obtenir une cinétique de production d'ATP mitochondrial. Le dosage a été effectué à l'aide du kit Enliten ATP assay (Promega) et dosés à l'aide d'un luminomètre à 560 nm (Promega Glomax 20/20 luminometer) selon la réaction suivante :

D-luciférine + ATP + O₂ → Oxyluciférine + AMP + PPi + CO₂ + Lumière (560 nm)

L'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la concentration en ATP synthétisée et contenue dans l'échantillon. Au préalable une gamme étalon d'ATP est dosée et sert à calculer la concentration réelle dans nos échantillons.

Six prélèvements de 10 μ L de la solution contenue dans la cuve réactionnelle ont été effectués toutes les 40 secondes à l'état 3 (en présence d'ADP 1,5 mM + Glutamate 5 mM +

Malate 5 mM + Succinate 10 mM). La réaction de synthèse d'ATP a alors été stoppée par ajout de 10 μ l d'un mélange contenant 25 mM d'EDTA et 10% d'acide perchlorique. Les échantillons ont ensuite été neutralisés avec 1980 μ L de tampon de neutralisation (Hepes (25 mM) et EDTA (2 mM), pH = 7,75).

La mesure de la synthèse d'ATP a été effectuée avec 10 μ L de solution d'ATP standard ou d'échantillons et 50 μ L de la solution luciférine-luciférase contenu dans le kit commercial. Le blanc a été réalisé avec du tampon de neutralisation, puis une gamme d'étalonnage (solution d'ATP standard allant de 10⁻¹¹ à 10⁻⁷ mM) a été dosée. Les échantillons ont ensuite été dosés. Ceci nous a permis d'obtenir la quantité d'ATP produit par la mitochondrie en nanomoles d'ATP/min/million de cellules.

c. Mesure de l'efficacité de la phosphorylation oxydative

L'efficacité de la phosphorylation oxydative est obtenue en mesurant la synthèse d'ATP mitochondriale et la consommation d'oxygène mitochondriale correspondante de manière parallèle. Le rapport ATP/O ainsi calculé permet de mesurer l'efficacité de la phosphorylation oxydative.

d. Potentiel de membrane mitochondrial

Le potentiel de membrane mitochondrial a été déterminé par spectrofluorimétrie et l'utilisation de la sonde fluorescente et ratiométrique JC-1 (ThermoFisher). Cette sonde peut se présenter sous deux formes, une forme multimérique ou « aggrégat » émettant dans le rouge (550 nm/590 nm) (exc/em) reflétant une mitochondrie fonctionnelle et donc la présence d'un potentiel de membrane mitochondrial ou une forme monomérique ou « isolée » émettant dans le vert (485 nm/530 nm) (exc/em) reflétant une mitochondrie non fonctionnelle et donc une perte du potentiel de membrane. Une diminution du ratio forme multimérique / forme monomérique traduit une dépolarisation de la membrane mitochondriale et donc un potentiel qui tend vers O. Le FCCP (molécule protonophore entrainant une perte du potentiel de membrane mitochondrial) a été utilisé comme condition témoin d'un potentiel de membrane nul (diminution du rapport forme multimérique / forme monomérique).

La mesure a été réalisée avec 3 millions de cellules préalablement perméabilisées (selon le protocole décrit précédement) avec l'utilisation d'un spectrofluorimètre (fluorescence

- 111 -

spectrophotmètre F2500 – Hitachi) à 37°C sous agitation constante. Les cellules ont été ajoutées dans la cuve contenant 1,5 mL de tampon de respiration avec ASB, plusieurs substrats des différents complexes de la CRM (Glutamate 5 mM + Malate 5 mM + Succinate 10 mM), du NAD⁺ (0,5 mM), du iodoacétate (2 mM), de l'ADP (1,5 mM) et la sonde JC-1 (0,5 μ M). Dès l'obtention de signaux stables pour chacune des deux longueurs d'ondes de la sonde, un ajout d'oligomycine (5,25 μ g/mL) a été effectué, puis 0,5 μ L de FCCP (2 μ M) ont été ajoutés. Le potentiel de membrane mitochondrial a été déterminé pour chaque état respiratoire en calculant le ratio (forme multimérique / forme monomérique) des deux valeurs de fluorescence obtenus pour chaque forme de la sonde JC-1.

e. Mesure de l'ouverture du Pore de Transition de Perméabilité (mPTP) : Rétention calcique

La mesure de la capacité de rétention calcique a été réalisée par spectrofluorimétrie à l'aide la sonde Calcium Green-5N (506 nm/ 532 nm) (exc/em) (ThermoFisher) permettant le suivi de la concentration calcique extra-mitochondriale.

Le calcium (inducteur de l'ouverture du PTP) est ajouté de manière séquentielle à la suspension cellulaire sur cellules perméabilisées. Le relargage du calcium dans l'espace extramitochondrial, traduisant l'ouverture du PTP, est visualisé par une augmentation de la fluorescence de la sonde utilisée (voir courbe ci-dessous). La concentration de calcium nécessaire à l'ouverture du PTP représente la sensibilité d'ouverture du pore et donc la capacité de rétention calcique des mitochondries **Figure 33**. L'utilisation d'une molécule inhibitrice du PTP entraine une augmentation du nombre d'ajouts de calcium nécessaire pour ouvrir celui-ci et l'effet inverse est obtenu avec une molécule activatrice.



Figure 33 : Représentation théorique d'une courbe obtenue lors de la mesure de l'ouverture du PTP.

Les mesures ont été réalisées sont cellules perméabilisées (selon le protocole décrit précédement) à l'aide du spectrofluorimètre F2500 (Hitachi) à 37°C sous agitation constante. Les cellules ont été rajoutées dans la cuve contenant au préalable 1,5 mL de tampon de rétention calcique **Tableau 6**, 0,25 μ M de Calcium Green-5N, 1 mM de Na₃PO₄ et des substrats de la CRM (Glutamate 5 mM + Malate 5 mM). Après 200 secondes, une première injection de calcium (2 μ L – soit 20 μ M) a été effectuée suivie d'une injection toutes les 100 secondes jusqu'à l'ouverture du PTP visualisée par une forte augmentation persistante de l'intensité de fluorescence de la sonde.

Produits utilisés	Concentration	
Sucrose	250 mM	
Tris-HCI	20 mM	
MOPS	10 mM	
pH = 7,4		

Tableau 6 :	Composition	du tampon	de rétention	calcique
-------------	-------------	-----------	--------------	----------

f. Mesure de la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) par la mitochondrie

i. Sur cellules en suspension

La détermination de la production d'ERO mitochondriale a été effectuée par spectrofluorimétrie à l'aide du couple Amplex Red / Horse Radish Peroxydase (HRP) en mesurant la quantité d' H_2O_2 produit par la mitochondrie par unité de temps. La réaction est la suivante :

HRP

H₂O₂ mitochondrial + Amplex Red → H₂O + Résorufine (560 nm/584 nm) (exc/em)

La variation de fluorescence de la résorufine a été convertie en concentration d' H_2O_2 produit grâce à l'utilisation d'une gamme étalon et nous a permis de déterminer la production d' H_2O_2 mitochondriale en nanomoles d' H_2O_2 / unité de temps / million de cellules.

Les mesures ont été réalisées avec 10 millions de cellules préalablement perméabilisées, à l'aide du spectrofluorimètre F2500 (Hitachi) à 37°C sous agitation constante. Dans un premier temps la mesure a été réalisée en conditions non phosphorylantes (sans ADP), en présence des substrats de la CRM (Glutamate 5 mM + Malate 5 mM), de 10 μ M d'Amplex Red (Sigma Aldrich), de 10 UI/mL d'HRP (Sigma Aldrich) et 40 UI/mL de superoxide dismutase (Sigma Aldrich). Cette condition nous a servi à déterminer la production d'ERO via le complexe I et III, puis le succinate (10 mM) a été rajouté pour mesurer la production d'ERO via le retour des électrons (flux inverse) au complexe I. Enfin de l'ADP (1,5 mM) a été rajouté pour mesurer la production d'ERO en conditions phosphorylantes. Ceci a été suivi d'ajouts progressifs de 2 μ L d'une solution d'H₂O₂ à 14,22 nM afin d'obtenir une gamme étalon.

g. Quantification des mitochondries

i. Mesure par dosage de l'activité maximale de la citrate synthase

La citrate synthase (CS) est une enzyme présente dans la matrice mitochondriale. Elle permet la formation de l'acide citrique dans le cycle de Krebs selon la réaction suivante :

Citrate synthase

Acétyl-CoA + Oxaloacétate + H₂O → Acide citrique + CoA-SH

Pour ce dosage l'acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque) (DTNB) est utilisé. Celui-ci réagit avec le groupement thiol (-SH) du CoA-SH formant ainsi le trinitrobenzène (TNB), composé jaune absorbant la lumière à 412 nM selon la réaction suivante :

 $2 \text{ CoA-SH} + 2 \text{ DTNB} \longrightarrow 2 \text{ TNB} + \text{CoA-S-S-CoA}.$

L'activité de la CS est proportionnelle à l'absorbance mesurée.

Après dosage de la concentration en protéines la méthode BCA (acide bicinchoninique) à l'aide du kit « BCA Assay » (ThermoFisher) selon les indications du fournisseur, 10 µg de chaque échantillon ont été déposés dans un puits de plaque 96 (bdBiosciences) ainsi que 200 µL du mélange de réactif **Tableau 7**. Cette plaque a ensuite été incubée à 37°C pendant 3 minutes, cette étape permet une lyse des membranes mitochondriales par le triton et ainsi de pouvoir avoir accès à la CS. Après incubation, 20 µL d'oxaloacétate (solution à 10 mM en eau distillée – Sigma Aldrich) par puits ont été rajoutés permettant à la réaction enzymatique de débuter. La variation de l'absorbance a été suivie à 412 nm pendant 3 minutes à 37°C par spectrophotométrie (SpectraMax 190 – Molecular Devices). Les résultats obtenus ont été exprimés en nanomoles de TNB/min.millions de cellules.

Tableau 7 : Composition du	i mélange de réactif	pour dosage de la CS
----------------------------	----------------------	----------------------

Produits utilisés	Concentration	Préparation
Tampon DTNB = Tris M	1 mM	Ajuster pH = 8,1
DTNB	1 mM	A préparer extemporanément
Acétyl CoA	10 mM	
Oxaloacétate (acide oxaloacétique)	10 mM	Ajuster pH = 7
Triton	10 %	

Pour 5 mL de mélange de réactif

Produits	Volume à prélever	Concentration finale
DTNB repris dans le tampon	550 μL	0,1 mM
Acétyl CoA	330 μL	0,6 mM
Triton 10%	2200 µL	4%
Eau distillée	qsp 5 mL	

ii. Mesure par microscopie électronique à balayage

Le nombre de mitochondries a aussi été déterminé par microscopie électronique à balayage. Pour cela les cellules ont été ensemencées en flacons de 25 cm² (bdBioSiences) et ensuite trypsinées et comptées. Les cellules ont ensuite été divisées afin d'avoir une densité de 0,5 millions de cellules / tubes et centrifugées à 700 x g pendant 3 minutes. Ce culot a été repris par aspiration/refoulement dans 2 mL de fixateur Trump (Formaldéhye 4%, Glutaraldéhyde 1% - 1 volume de fixateur pour 4 volume de cellules) puis conservé à 4°C. Les cellules fixées ont ensuite été apportées à la plateforme de microscopie électronique du CHRU Bretonneau (Plateforme R.I.O de Microscopie électronique). Elles ont été placées sur une résine durant 48 h préalablement déshydratée pendant 24 h, puis coupées à l'ultra-microtome et montées sur grille permettant l'observation par microscopie électronique à balayage.

L'analyse a été faite de la manière suivante : une photo de la cellule entière a été prise puis différentes vues des mitochondries de cette même cellule ont été réalisée à plus fort grossissement pour permettre une analyse individuelle. Dix cellules ont été analysées par conditions et dix images ont été prises par cellules. Les images ont ensuite été traitées avec le logiciel ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) afin de mesurer l'aire de la cellule, le nombre de mitochondries, l'aire totale occupée par les mitochondries, l'aire moyenne d'une mitochondrie et ainsi de déterminer le rapport (en %) : surface mitochondriale / surface cellulaire totale.

D. Isolement des mitochondries de cellules

a. Principe

L'isolement est effectué selon le principe de centrifugation différentielle. Cette technique consiste à séparer différents éléments cellulaires à l'aide de plusieurs cycles de centrifugation à vitesse croissante. Une première centrifugation à basse vitesse (800 x g) va « culoter » les éléments cellulaires les plus denses (débris cellulaires et noyaux) tandis que les autres dont les mitochondries vont rester dans le surnageant. Le surnageant est alors récupéré et centrifugé à plus forte vitesse (12 500 x g) permettant de « culoter » les éléments les plus denses : les mitochondries.

Toutes les étapes de cet isolement ont été réalisées à 4°C pour éviter toute dégradation des mitochondries. Deux protocoles ont été utilisés :

Isolement des mitochondries sur culots cellulaires congelés (pour la quantification des phospholipides totaux)

Les cellules ont été trypsinées puis centrifugées dans un premier temps à 700 x g pendant 5 minutes. Un lavage PBS sans calcium ni magnésium a été effectué afin d'éliminer toutes traces de milieu de culture ou de SVF puis les culots cellulaires ont été congelés à -20° C. L'isolement a ensuite été réalisé : le culot cellulaire est repris dans 5 mL de tampon d'isolement **Tableau 8** puis broyé avec l'aide d'un potter (10 allers-retours) et centrifugé à 800 x g pendant 10 minutes. Le surnageant S1 a été recupéré et conservé tandis que le culot a été de nouveau broyé et centrifugé à 1 000 x g pendant 10 minutes. Le deuxième surnageant S2 a été récupéré et a été ajouté au surnageant S1. Ce mélange de surnageant a été centrifugé à 12 500 x g pendant 15 minutes. Le culot final obtenu contenant les mitochondries a été remis en suspension dans un volume approprié de tampon d'isolement et congelé à -20° C.

Isolement des mitochondries sur cellules en culture (pour mesure la de l'accumulation de doxorubicine sur mitochondries isolées)

L'isolement des mitochondries s'effectue directement après trypsination des cellules. Les cellules ont été trypsinées puis centrifugées dans un premier temps à 700 x g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire a été repris dans 2 mL de tampon de respiration sans ASB puis les cellules ont été perméabilisées par la digitonine (selon le protocole décrit précédement). L'arrêt de la perméabilisation a été réalisé par un ajout de 10 mL de tampon d'isolement. Les cellules ont été centrifugées à 800 x g pendant 10 minutes puis l'isolement a été réalisé de la même manière que pour les culots congelés. La quantité de protéines a été ensuite mesurée par l'utilisation du kit « BCA Assay ».

Produits utilisés	Concentration	
Sucrose	0,25 mM	
EDTA	0,2 mM	
Tris-HCl	10 mM	
pH = 7,4		

Tableau 8 : Composition du tampon d'isolement mitochondrial

E. Mesure de l'accumulation de doxorubicine sur mitochondries isolées

Des expériences d'accumulation de doxorubicine (molécule auto-fluorescente - 470 nm/ 585 nm) ont été réalisées sur mitochondries isolées. Les mitochondries ont été mises en contact avec la doxorubicine puis lavées. L'intensité de fluorescence intra mitochondriale reflétant l'accumulation de la doxorubicine a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre multimode à filtre.

Les mitochondries ont été isolées selon le protocole décrit précédemment. Cinquante μ g de mitochondries ont été ajoutés à 1 mL de tampon de respiration mitochondrial **Tableau 9** contenant différents substrats (succinate 2,5 mM, ATP et ADP 1,5 mM) avec ou sans inhibiteurs des pompes d'efflux : Mitotane (5 μ M – inhibiteur BCRP), MK-571 (25 μ M – inhibiteur MRP1) et Vérapamil (5 μ M – inhibiteur P-gp). La doxorubicine (5 μ M) a ensuite été ajoutée et les échantillons ont été incubés pendant 30 minutes à 25°C dans un bain marie thermostaté. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 12 500 x g pendant 3 minutes et les culots ont été repris dans 200 μ L de tampon de respiration mitochondriale. Cette étape a été répétée 2 fois et la fluorescence finale a été mésurée (485 nm/ 535 nm) (exc/em) à l'aide du spectrophotomètre multi-mode à filtre (Mithras LB940 Multimode Microplate Reader, Berthold Technologies).

Produits utilisés	Concentration	
KCI	120 mM	
H ₂ PO ₄	5 mM	
HEPES	3 mM	
MgCl ₂	2 mM	
EGTA	1 mM	
BSA	0,3 %	
pH = 7,4		

Tableau 9 : Composition du tampon de respiration mitochondrial pour mitochondries isolées

F. Etude de la présence des pompes d'efflux au niveau mitochondrial

a. Etude par microscopie confocale à fluorescence

Les cellules ont été ensemencées à 21 000 cellules par puits sur lame de verre 8 puits (Lab-Tek chamber 8-well, ThermoFisher). Vingt-quatre heures après l'ensemencement, les mitochondries ont été marquées à l'aide du Mitotracker Deep Red (Molecular Probes) à 1 μ M pendant 1 h à 37°C – 5% CO₂. Les cellules ont été rincées avec du PBS avec calcium et magnésium puis fixées 15 minutes à température ambiante, sans agitation, avec une solution de PBS avec calcium et magnésium contenant 4% de formaldéhyde (Carlo Erba Reagent). Les cellules ont ensuite été perméabilisées 3 x 5 minutes (sous agitation) à l'aide d'une solution de triton 0,1% réalisée en PBS avec calcium et magnésium puis saturés 30 minutes sous agitation avec une solution d'ASB 3% en PBS avec calcium et magnésium.

Le marquage des pompes d'efflux ATP dépendantes a été réalisé, après le marquage mitochondrial, de la manière suivante : l'anticorps anti-MRP1 (souris, ab24102 – Abcam) ou l'anticorps anti-BCRP [BXP-34] (souris, ab3379 – Abcam) ont été dilués en PBS avec calcium et magnésium contenant 4% de BSA à 1/100^{ème} et incubés 1 h, à température ambiante, sous agitation. Les cellules ont ensuite été incubés 1 h, à température ambiante, sous agitation, avec les anticorps secondaires anti-souris, couplé à une sonde fluorescente rouge Alexa fluor 488

(Molecular Probes) dilués au 1/400^{ème} en BSA 4%. Les puits ont ensuite été rincés et la lamelle a été fixée grâce au milieu de montage (Fluorescent Mounting Medium, DAKO).

L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence avec un grossissement x600 (Olympus Fluoview FV500 Laser Scanning Confocal Microscope). L'analyse et le traitement des images a été réalisé sur le logiciel Fluoview 500 v5 (Olympus) situé sur la plateforme de microscopie du CHRU de l'Hôpital Bretonneau (Plateforme R.I.O de microscopie électronique).

b. Etude par microscopie multispectrale

Les mitochondries ont été isolées selon le protocole précédemment décrit, puis marquées au Mitotracker Deep Red (5 μ M – Molecular Probes) pendant 1 h à 37°C. Cent μ g de mitochondries ont été déposés / puits, laissées adhérer pendant 1 h puis fixées au formaldéhyde 4%. Les anticorps primaire anti-MRP1 (souris, ab24102 – Abcam) ou anti-BCRP [BXP-34] (souris, ab3379 – Abcam) ont été dilués dans du PBS avec calcium et magnésium contenant 4% de ASB au 1/40^{ème} et incubés toute la nuit à 4°C, sous agitation. Les puits ont ensuite été rincés et l'anticorps secondaire anti-souris, couplé à une sonde fluorescente vert Alexa fluor 488 (Molecular Probes) dilués au 1/400^{ème} en ASB 4% a été incubé pendant 1 h, à température ambiante, sous agitation.

La fluorescence a été mesurée via l'utilisation d'un micro spectrophotomètre confocal à balayage LabRam (Horiba-Jobin Yvon) en utilisant le mode de faible dispersion (grille de 300 rainures / mm) (en collaboration avec le Pr I. CHOURPA, laboratoire E.A. 6295 Nanomédicaments et Nanosondes, TOURS). Les agrégats de mitochondries isolées ont été scanné en plan X-Y avec un pas fixé à 0,8 μ m. Les cartes obtenues contenaient entre 100 et 400 spectres (10 × 10 à 20 × 20 points). L'acquisition et le traitement des cartes multispectrales ont été réalisés avec le logiciel LabSpec.

G. Quantification des phospholipides mitochondriaux

a. Extraction des phospholipides

L'extraction des phospholipides des membranes mitochondriales a été réalisée selon la technique de Bligh & Dyer (Bligh & Dyer, 1959) à partir de l'isolement réalisé sur culots cellulaires congelés précédemment décrit. Cette méthode d'extraction est basée sur les

Le protocole est décrit dans la Figure 34.

phase ».



Figure 34 : Protocole d'extraction des lipides par la méthode de Bligh et Dyer.

Dans un premier temps, le culot mitochondrial a été suspendu dans 6 mL d'un mélange chloroforme/méthanol/eau (2 :2 :1, v/v) puis vortexé et centrifugé à 2 500 x g pendant 10 minutes. L'utilisation de ce mélange permet une déstructuration et la solubilisation des membranes mitochondriales et de ses phospholipides. Le surnageant a été transféré dans un autre tube contenant 4 mL d'un mélange chloroforme/eau (1 :1, v/v) et le culot a été repris dans un mélange chloroforme/méthanol/eau (2 :2 :1, v/v) pour en extraire les phospholipides restants. Les deux tubes ont été centrifugés à 2 500 x g pendant 10 minutes. L'ajout de chloroforme et d'eau permet de séparer les composants de la membrane mitochondriale en une phase organique et une phase aqueuse en fonction de leur polarité. La phase organique (apolaire) qui contient les phospholipides a été filtrée sur laine de verre et sulfate de sodium pour en éliminer toutes traces d'eau éventuelle. L'extrait de lipides totaux obtenu a été évaporé sous azote et mis en solution dans un mélange chloroforme/méthanol (2 :1, v/v).

b. Méthode High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

La quantité des différents phospholipides mitochondriaux a été mesurée par méthode HPTLC. Des gammes d'étalonnages pour chacun des phospholipides ont été utilisées. Les échantillons obtenus par l'extraction par la méthode de Bligh et Dyer ou les standards de phospholipides (Sigma Aldrich) ont été déposés sur des plaques de silice (Merck Millipore), préalablement activées à 120°C pendant 30 minutes afin d'éliminer toutes traces d'eau pouvant diminuer l'interaction entre la silice et les lipides, à l'aide de l'ATS4 (Automatic TLC Sampler puis mis migrer 4 Camag) à dans une phase mobile composée d'ethanol/triéthylamine/chloroforme/eau (35:35:30:7, v/v). Suite au séchage, les plaques ont été révélées après immersion dans du sulfate de cuivre à 10% (m/v) repris dans une solution d'acide phosphorique à 8% (v/v) et chauffage à 160°C pendant 15 minutes. Ce procédé appelé « carbonisation » permet de visualiser tous les phospholipides présents sur la plaque. L'intensité des spots obtenus a été quantifiée à l'aide de TLC-Visualizer Reprostar 3 (Camag) et du logiciel WinCats (Camag) et les phospholipides quantifiés grâce aux diverses courbes d'étalonnages spécifiques de chaque espèces. Les images ont ensuite été traitées et les spots intégrés grâce au logiciel VideoScan (Camag).

H. Etude de l'expression protéique

La technique dite de « Western-Blotting » a été utilisée pour étudier l'expression de différentes protéines. C'est une technique semi-quantitative qui permet de déterminer la présence d'une protéine d'intérêt au sein d'un échantillon. Elle se compose de trois étapes indispensables :

- Une séparation des protéines selon leur poids moléculaires par électrophorèse sur gel d'acrylamide en condition dénaturante (SDS)
- Un transfert des protéines sur membrane PVDF

• Une révélation spécifique de la protéine d'intérêt par immunomarquage. La membrane est incubée en présence d'une solution contenant l'anticorps « primaire » dirigé contre l'épitope spécifique de la protéine sur lequel il va se fixer. Après rinçage la membrane est de nouveau incubée avec un anticorps dit « secondaire » couplé à la peroxydase (HRP). Celui-ci va s'hybrider avec l'anticorps « primaire » formant un complexe visualisable après

peroxydation du luminol par l'HRP. La détection est réalisée à l'aide d'un kit de chimioluminescence et d'un imageur.

a. Préparation des échantillons

Les cellules ont été ensemencées sur plaque 6 puits (bdBioScience) à une densité de 10 000 cellules / cm² pour les MCF-7 et à une densité de 7 000 cellules / cm² pour les MCF-7 dox. Après 72h, les cellules ont été rincées à plusieurs reprises avec du PBS avec calcium et magnésium. Un mélange PBS avec calcium et magnésium et tampon de charge (dénaturant et réducteur - **Tableau 10**) = 100 μ L de PBS + 100 μ L de tampon de charge 1X / puits a ensuite été utilisé afin de lyser les cellules et de dénaturer les protéines. Les cellules ont été décollées par grattage à l'aide d'un cône. Les échantillons ont été passés dans une seringue (5 allers-retours) afin de détériorer l'ADN génomique libéré lors de la lyse cellulaire puis stockés à -80°C. Avant la séparation sur gel d'acrylamide, les échantillons ont été chauffés à 50°C pendant 5 minutes afin de dénaturer les interactions protéiques.

Produits utilisés	Concentration
Tris HCl pH = 6,8	0,25 M
SDS	4,6 %
Glycérol	20 %
βmercaptoéthanol	10 %
Bleu de bromophénol	

Tableau 10 : Composition du tampon de charge = tampon de Laemli 5X

b. Séparation des protéines sur gel d'acrylamide

Le gel d'acrylamide est constitué d'un gel de concentration et d'un gel de séparation (permettant une migration et une séparation en fonction de la masse moléculaire). Un gel de séparation à 10% d'acrylamide a été utilisé afin de séparer nos protéines d'intérêts. Trente μ L de chaque échantillon et 7 μ l de marqueur de poids moléculaire (Prism Ultra Protein Ladder – ab116027 – Abcam) ont été déposés dans les puits. La migration a été réalisée à 120 volts pendant environ 1 h après ajout du tampon d'électrophorèse **Tableau 11**.

Produits utilisés	Concentration	
Glycine	190 mM	
Trizma Base	25 mM	
SDS	0,1 %	
pH = 8,3		

Tableau 11 : Composition du tampon d'électrophorèse 10X

Attention : le SDS est a rajouté en dernier lors de la préparation du tampon.

c. Transfert sur membrane PVDF

Après migration, les protéines ont été transférées sur membrane PVDF (PolyVinyliDène Fluorine) préalablement activée pendant 1 minute dans du méthanol pur. Le transfert semi-sec a été réalisé pendant 30 minutes à 25 volts.

d. Immunomarquage et révélation des protéines d'intérêts

Après transfert, la membrane a été incubée avec du rouge ponceau afin de s'assurer de la présence des protéines sur la membrane (permet un contrôle du transfert). Celle-ci a été ensuite incubée pendant 1 h à température ambiante sous agitation dans une solution de TTBS **Tableau 12** contenant 5% (m/v) de lait écrémé en poudre. Cette étape permet une saturation de la membrane évitant ainsi une fixation non spécifique des anticorps. Après rinçage, la membrane a ensuite été incubée toute la nuit, à 4°C, sous agitation avec l'anticorps primaire **Tableau 13**. Les anticorps ont été dilués dans une solution de TTBS avec 5% (m/v) de lait. Par la suite, l'anticorps secondaire a été incubé 1 h avec la membrane, sous agitation, à température ambiante.

Tableau 12 : Composition du TTBS

Produis utilisés	Concentration	
NaCl	150 mM	
Tris HCl	10 mM	
Tween 20	0,1%	
pH = 7,4		

Protéine d'intérêt	Anticorps	Référence	Fournisseur	Poids moléculaire	Dilution utilisée
Complexe I	Anti Grim 19	ab110240	Abcam	17 kDa	1/1000
Tafazzine	Fourni par S.Claypool		28 kDa	1/1000	
βadaptine	βadaptine	sc-58226	Santa-cruz biotechnology	109 kDa	1/1000
βActine couplé HRP	βActine	sc-47778	Santa-cruz biotechnology	41 kDa	1/1000

Tableau 13 : Tableaux des anticorps utilisés

e. Détection des protéines

La membrane a ensuite été lavée avec du TTBS pour en éliminer toutes traces d'anticorps non fixés (3 rinçages de 15 minutes sous agitation) puis incubée pendant 1 minute, à l'obscurité, dans les réactifs du kit de chimioluminescence (Pierce ECL Western Blotting Substrate, ThermoScientific) et détectées à l'aide d'un imageur Fusion Fx (Vilber Lourmat).

L'expression des protéines d'intérêts et des protéines contrôles (β-adaptine ou actine) a été quantifiée avec le logiciel Multi-Gauge (Fujifilm). Les résultats ont été exprimés après normalisation par l'expression des protéines contrôles.

I. Etude de l'expression génique par RT-qPCR

a. Principe

L'expression génique du gène codant pour la *CLS1* a été étudiée par la méthode de qPCR (réaction de polymérysation en chaîne quantitative). Elle permet l'amplification et la quantification d'une séquence d'ADN complémentaire (ADNc) cible. Une extraction des ARN totaux et une réaction de transcription inverse (RT) est au préalable nécessaire afin d'obtenir de brins d'ADNc.

La méthode des $\Delta\Delta$ Ct a été utilisée pour l'analyse des résultats. Elle permet une comparaison des Ct (cycle seuil) de manière relative. Le Ct correspond au cycle d'amplification à partir duquel le bruit de fond est dépassé.

Cette méthode d'analyse est réalisée en trois étapes :

• Une normalisation par rapport au contrôle endogène (*HPRT1* - gène de ménage) Δ Ct échantillon = Ct gène cible – Ct contrôle endogène

- Puis une normalisation par rapport à la condition contrôle $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ \'echantillon} - \Delta Ct \text{ condition contrôle}$
- Enfin, un calcul du nombre de copie du gène cible

$$O = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

b. Mode opératoire

i. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été isolés avec le kit « Total RNA Isolation Nucleospin RNAII » (Macherey Nagel) selon les instructions de la notice fournisseur. Les cellules ont été lysées puis filtrées à l'aide d'une colonne de silice par centrifugation à 11 000 g pendant 1 minute. Une endonucléase a été utilisée par la suite pour éliminer toute trace d'ADN de l'échantillon. Les ARN totaux alors obtenus et élués dans une eau « RNAse Free » ont été dosés à l'aide du NanoDrop 2000 (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermoscientific – logiciel pour mesure : NanoDrop 2000/2000c) pour vérifier que les échantillons n'étaient pas contaminés (A260 nm/A280 nm < 1,8 = contamination protéique – A260 nm/A230 nm < 2 = contamination solvants).

ii. Transcription inverse : ARN en ADN complémentaire

La transcription inverse des ADNc obtenus a été réalisée par l'action d'une ADN polymérase ARN dépendante (reverse transcriptase).

Le kit PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara) a été utilisé ainsi qu'un thermocycleur (Labcycler, SensoQuest).

La réaction a été réalisée de la manière suivante : Volume final = 10 μ L d'H₂O RNase Free contenant 0.5 μ g d'ARN et les réactifs du kit **Tableau 14** sont mis en contact puis des variations de température ont été effectuées grâce au thermocycleur (15 minutes à 37°C = transcription inverse, 5 secondes à 85°C = inactivation de l'enzyme) et les échantillons ont été refroidis à 4°C.

Produits utilisés	Volume (qsp 10 μ L avec H $_2$ O RNase Free) pour un échantillon
PrimeScript [™] Buffer	2 μL
PrimeScript [™] RT enzyme Mix	0,5 μL
Oligo dT primer	0,5 μL
Random 6 mers	0,5 μL
ARN totaux	Volume equivalent à 0,5 µg

Tableau 14 : Transcription inverse

Attention: le PrimeScript TM RT enzyme Mix est à sortir au dernier moment, à conserver dans la glace et à mettre en dernier dans le tube réactionnel. Les échantillons sont à conserver dans la glace une fois l'enzyme rajoutée.

iii. Réaction de polymérisation en chaîne quantitative

La réaction de qPCR a été réalisée grâce à l'action d'une ADN polymérase (Taq polymérase) et a été suivie en temps réel grâce à la fluorescence émise par le SybrGreen (intercalant du double brin d'ADN – contenant la Taq polymérase, les nucléotides et le Mg²⁺).

Le mélange utilisé pour la qPCR a été réalisé dans un volume final de 25 μ L contenant: 50 ng d'ADNc, 13 μ L de SybrGreen et 1 μ L de chaque amorce (**Tableau 15** - reverse et forward). Un thermocycleur (MyiQ, Biorad) a été utilisé pour réaliser la qPCR selon le protocole suivant :

Activation de la Taq Ploymérase : 2 minutes à 50°C Dénaturation complète : 2 minutes 95°C Dénaturation : 15 secondes 95°C Hybridation : 30 secondes à T = 60°C (température d'hybridation des amorces) Elongation : 30 secondes à 72°C Réalisation des courbes de fusion (vérification de la spécificité des amorces)

Tableau 15 : Séquence des amorces utilisées pour le RT-qPCR (SigmaAldrich)

Gènes cibles	Amorce sens « forward »	Amorce antisens « reverse »
Cardiolipine synthase	CAACACCACGAACACTTGCC	CTGAACAGTCTTCCGGCCAT
HPRT	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTCAGTCCT

Chapitre III : Résultats

A. Article 1 : Rôle du complexe I mitochondrial et du métabolisme des cardiolipines dans la résistance des cellules cancéreuses mammaires MCF-7dox à la doxorubicine

a. Introduction

Les propriétés métaboliques des cellules cancéreuses sont désormais considérées comme une des cibles thérapeutiques. Il semble que ce soit aussi le cas dans le cadre de la résistance aux traitements anticancéreux. Cependant les mécanismes précis impliqués dans la relation entre le phénotype métabolique (glycolyse « aérobie » versus métabolisme énergétique mitochondrial) et la sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements anticancéreux restent très largement discutés.

Le complexe I mitochondrial est le premier complexe de la chaîne respiratoire et (1) permet l'oxydation du NADH, la principale source d'équivalents réduits de la chaîne respiratoire mitochondriale, jouant ainsi un rôle très important dans le phénotype métabolique, (2) participe à la production d'ERO mitochondriale et (3) peut participer à la mort cellulaire via l'ouverture du mPTP.

Les CL influent sur les fonctions mitochondriales (production d'énergie, production d'ERO et mort cellulaire). Ces phospholipides ont également été décrits pour se complexer avec la doxorubicine. Ce complexe jouerait un rôle dans la formation d'un stress oxydant induit par la réduction de la doxorubicine et pourrait participer aux effets toxiques de cette molécule.

Dans cette étude, nous avions émis l'hypothèse que la résistance des cellules cancéreuses mammaires à la doxorubicine était associée à un métabolisme énergétique mitochondrial et à un métabolisme des CL particuliers.

A role for mitochondrial respiratory chain complex 1 and cardiolipin metabolism in doxorubicin resistance in breast cancer cells

Julie Dartier ^{a, b}, Elsa Lemaitre ^a, Valérie Desquiret-Dumas ^{c, d, e}, Naig Gueguen ^{c, d, e}, Michelle Pinault ^{a, b}, Cyrille Guimaraes ^a, Hélène Blasco ^{f, g}, Stéphan Chevalier ^{a, b, h} Stéphane Servais ^{a, b}, Steven Claypool ⁱ, Grant Hatch ^j, Karine Mahéo ^{a, b, h, 1} and Jean-François Dumas ^{a, b,h, 1}

^a INSERM UMR1069, "Nutrition, Croissance et Cancer", Tours, France.
^b Université François Rabelais, Tours, France.

^c Université d'Angers, Angers, France.

^d Département de Biochimie et Génétique, CHU d'Angers, Angers, France. ^e UMR CNRS 6214-INSERM U1083, Angers, France.

^f Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHRU Bretonneau, Tours, France.

^g INSERM U930, « équipe Neurogenetics and Neurometabolomics », Tours, France. ^h UFR Sciences Pharmaceutiques, Tours, France

ⁱ Department of Physiology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA.

^j Department of Pharmacology and Therapeutics, Biochemistry and Medical Genetics, Faculty of Health Sciences, Center for Research and Treatment of Atherosclerosis, DREAM Manitoba Institute of Child Health, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada.

¹ These authors contributed equally to this work

Address for reprint requests and other correspondence:

Jean-François Dumas, INSERM UMR1069, Laboratoire de Nutrition, Croissance et Cancer, Faculté de Médecine, Bâtiment Dutrochet, 10 boulevard Tonnellé, F-37032 TOURS, Cedex 1, France. tel: +33 247 36 60 59, fax: +33 247 36 62 26, e-mail: jean-francois.dumas@univ-tours.fr

Karine Mahéo, INSERM UMR1069, Laboratoire de Nutrition, Croissance et Cancer, Faculté de Médecine, Bâtiment Dutrochet, 10 boulevard Tonnellé, F-37032 TOURS, Cedex 1, France. tel: +33 247 36 62 13, fax: +33 247 36 62 26, e-mail: karine.maheo@univ-tours.fr

Abstract

Introduction: The aim of this study was to investigate the role of mitochondria, especially respiratory chain complex I, and cardiolipin (CL) metabolism in doxorubicin (DOX) resistance in breast cancer.

Methods: Metabolic characteristics (glucose consumption, lactate production, mitochondrial oxygen consumption, mitochondrial respiratory chain complexes activity, complex I assembly and mitochondrial supercomplexes content), reactive oxygen species (ROS) production, opening of permeability transition pore (PTP), DOX-cell death and cardiolipin (CL) metabolism (CL and MLCL content, activity or quantity of enzymes involved in synthesis and remodeling of CL) were determined in DOXsenstitive (MCF-7^S) and –resistant (MCF-7dox^R) breast cancer cells.

Results: In MCF-7dox^R cells, glycolysis was enhanced and mitochondrial oxygen consumption was decreased (-41%), in part, due to a lower activity of mitochondrial respiratory chain complex I (-49%) while mitochondria were not defective to produce ATP. Complex I was not correctly assembled and the quantity of supercomplexes was reduced in MCF-7dox^R. The decrease activity of complex I was associated to a lower redox cycling of DOX resulting in a reduced production of ROS and in turn in a delay in opening of PTP under DOX oxidative stress. In addition, inhibition of complex I activity by rotenone or hypoxia decreased the DOX-induced cell death in MCF-7^S. Interestingly, an accumulation of MLCL, the immature form of CL anda decreased CL content was reported in MCF-7dox^R in MCF-7dox^R. These changes were due to a perturbation in CL synthesis (decreased activity of CL synthase) and remodeling (reduced content of TAZ protein).

Conclusion: Our data support a role for mitochondrial respiratory chain complex I and cardiolipin metabolism in DOX resistance in breast cancer cells.

Keywords: cardiolipin remodeling, complex I assembly, PTP, ROS, supercomplexes.

Abbreviations: cardiolipins: CL; doxorubin: DOX; monolysocardiolpin: MLCL; permeability transition pore: PTP; reactive oxygen species: ROS; tafazzin: TAZ.

Introduction

Breast cancer is the most common malignant tumors affecting adult women [1]. The anthracycline doxorubicin (DOX) is one of the most widely clinical anticancer agents used, however, a major problem with DOX treatment is the occurrence of drug resistance in cancer cells whose mechanisms are still not fully understood [2].

In general, anaerobic glycolysis (converting the majority of their glucose carbon to lactate, even in oxygen-rich conditions) in cancer cells is upregulated [3], [4]. However, in contrast to Warburg's original hypothesis, the metabolic switch (from mitochondrial oxidative phosphorylation to anaerobic glycolysis) is not necessarily due to an impairment of mitochondrial activity. Indeed, in most cancer cells, mitochondria are not defective in their ability to carry out oxidative phosphorylation that produces as much ATP as oxidative phosphorylation in normal tissue under the same oxygen pressures [5], [6]. Therefore, various forms of metabolic phenotype (or metabolic reprogramming) have been observed in cancer cells. Within the tumor, some cancer cells quickly interchange the metabolism between anaerobic glycolysis and mitochondrial metabolism, according to the presence or absence of nutrients and environmental conditions, thus showing a large plasticity [7]. Metabolic reprogramming is also associated with either inherent or acquired anticancer drugs resistance in cancer cells [8], [9], [10], [11], [12]. Targeting cellular metabolism is becoming a promising strategy to counteract drug resistance in cancer therapy. However, the precise role of metabolic characteristics (anaerobic glycolysis vs mitochondrial metabolism) of cancer cells in the development of chemoresistance remains to be fully elucidated, especially in the case of anthracycline treatment during breast cancer.

Complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) is the largest and least understood component of the mitochondrial respiratory chain. This complex initiates the electron transport by oxidizing NADH to NAD⁺, the main substrate for mitochondrial respiratory, in order to synthetize ATP. It has been shown that reducing complex I activity could be involved in metabolic reprogramming [13], [14]. In addition to its central role in ATP production for cell function, mitochondria are also a crucial regulator in cell death [15]. The permeability transition pore (PTP), an inner mitochondrial membrane channel, is a key effector in the mitochondrial pathways to cell death [16]. Some widely used chemotherapeutics act at least in part by inducing the PTP in a reactive oxygen species

(ROS)-dependent way [17]. On the contrary, inhibition of PTP prevents oxidative stressinduced cell death [18]. In several cell types, direct or indirect inhibition of complex I has been shown to prevent PTP opening in a ROS-dependent way [19], [20], [21]. Mitochondria are an important site of ROS production occurring during the process of electron transfer by mitochondrial electron-transport chain enzymes, mainly at complex I and complex III [22], [23]. During DOX-induced cardiotoxicity, ROS are produced directly by redox cycling at complex I [24]. Therefore, the ability of cancer cells to handle DOXinduced oxidative stress is fundamental for the protection of cells against the cytotoxic effect of this drug and hence for the development of chemoresistance Diphosphatidylglycerol or cardiolipin (CL) is a unique phospholipid that is almost exclusively localized at the level of the inner mitochondrial membrane. CL is essential for a wide range of processes as oxidative phosphorylation or cell death including opening of PTP [25], [26]. Alterations in CL content and fatty acid composition have been associated with mitochondrial dysfunction in multiple tissues in several physiopathological conditions [27]. CL is therefore considered as the signature phospholipid of mitochondria. DOX has a very high affinity to CL [28]. DOX, by interfering with CL, was reported to disrupt the electron transport chain and reduced myocardial energy status [29], [30]. In addition, it has been showed that CL metabolism was associated to oxidative stress-induced cell death in response to DOX in B-lymphocytes [31]. CL metabolism in DOX-resistant mammary cancer cells have to be precisely characterized.

We therefore hypothesized that the resistance of breast cancer cells to DOX could be mediated by changes in mitochondrial energy metabolism and/or CL metabolism. We particularly investigated mitochondrial complex I and its relationship with the redox cycling of DOX and opening of PTP, CL content and the activity/content of enzymes involved in CL biosynthesis and remodeling in MCF-7dox^R, a breast cancer cell line resistant to DOX, and in MCF-7^S, a breast cancer cell line sensitive to DOX.

Materials and methods

Drugs and chemicals

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich Chimie, France).

Cell culture

The human breast carcinoma cell lines MCF-7^S were obtained from American Type Culture Collection (LGC Promochem, France) and the MCF-7dox^R line was a gift of Dr. K. Cowan (National Cancer Institute, Bethesda, MD). MCF-7^S is a drug-sensitive cell line. The MCF-7dox^R was originally established by *in vitro* selection with chronic increasing concentrations of doxorubicin (DOX) [32]. The two cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS). MCF-7dox^R cells were also grown in the presence of 1 μ M DOX to maintain the multidrugresistant phenotype. One week before experiments were performed, MCF-7dox^R cells were removed from DOX-containing medium and maintained in DOX-free medium as described previously [32]. All the cell lines were cultured at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. The culture medium was changed each 72h.

Glucose and lactate assay

MCF-7^S and MCF-7dox^R cells were seeded into 25 cm² flasks with 5 mL of culture media. To determine the ratio lactate production/glucose consumption, the media were collected after 24h in contact with cells and assayed for glucose and lactate levels by using glucose assay kit (Randox GL 2623, Randox Laboratories, Crumlin, United-Kingdom) and lactate assay kit (kit Olympus OSR6193, Olympus life science research europa, O'callaghans Mills, Ireland) according to the manufacturer's instructions. The values were analyzed by the OD values. Glucose consumption and lactate production were calculated based on the standard curve, normalized to the cell number and time.

Mitochondrial oxygen consumption

Oxygen was measured by high resolution respirometry using a 2-mL chamber OROBOROS Oxygraph 2K (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) at 37°C as

previously described [33]. Mitochondrial oxygen consumption rates were calculated as the time derivative of oxygen concentration measured in the closed respirometer and expressed per million viable cells and corrected by non-mitochondrial oxygen consumption measured with antimycin A (2 µM). For measurement in intact cells, basal oxygen consumption was measured in presence of DMEM 4.5 g/L glucose without FCS, energy-wasting-related oxygen was measured after adding of oligomycin (5.25 µg/mL) and uncoupled respiration was measured after adding of FCCP (80 nM). The oxygen consumption dedicated to mitochondrial ATP synthesis was calculated as basal oxygen consumption - energy-wasting-related oxygen. Oxygen consumption was also determined on permeabilized cells (1x10⁶ cells) by exposure to digitonin (8 μ g per 10⁶ cells for MCF-7^s and 10 µg per 10⁶ cells for MCF-7dox^R), were resuspended in the respiratory buffer (10 mM KH₂PO₄, 300 mM Mannitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA and 0.1% bovine serum albumin (BSA) fatty acid free, pH 7.4). Experiments were carried out with various combination of substrate: pyruvate and malate (5 mM) for complex I-driven mitochondrial oxygen consumption, succinate (10 mM) and rotenone complex II-driven mitochondrial consumption. (2.5)μM) for oxygen or N,N,N',N'Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD) and ascorbate (400 µM and 5 mM respectively) for complex IV-driven oxygen consumption and ADP (1.5 mM) for each combinations

Transmission electron microscopy for mitochondrial content determination

Cells were fixed by incubation for 24 hours in 4% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2). Then washed in phosphate-buffered saline (PBS) and postfixed by incubation with 2% osmium tetroxide for 1 hour. Samples were then fully dehydrated in a graded series of ethanol solutions followed by a propylene oxide bath. Pre-impregnation step was made by a propylene oxide/Epon resin mixture and finally overnight in pure resin for impregnation of the samples. Cells were then embedded in Epon resin, which was allowed to polymerize for 48 hours at 60°C. Ultra-thin sections (90 nm) of these blocks were obtained with a Leica EM UC7 ultramicrotome (Wetzlar, Germany). Sections were deposited on gold grids and stained with 2% uranyl acetate, 5% lead citrate. Microscopy was performed using a JEOL 1011 transmission electron microscope. Images were analyzed using ImageJ software (NIH). Analyses were performed on 10 cells analysis for each sections. This was repeated 4 times.

Citrate synthase activity

Citrate synthase activity were measured by using the reaction catalyzed by citrate synthase as follows: Acetyl-CoA+oxaloacetate+H₂O \rightarrow citrate+CoA-SH (colorimetric reaction: CoASH+DTNB \rightarrow TNB+CoA-S-S-TNB). Citrate synthase activity was determined by measuring the appearance of the yellow product (TNB), which is observed spectrophotometrically by measuring absorbance at 412 nm. The citrate synthase reagent consisted of 0.1 mM DTNB, 4% Triton X-100, 0.6 mM acetyl CoA, and mitochondrial proteins samples (10 µg). The reaction regent (200 µl) included also 20 µl oxalacetate (10 mM) that was added to start the reaction. The absorbance changes were measured every 20 sec over 3 min at 412 nm for determine of the citrate synthase activity. All assays were carried out at 37°C. Activity of citrate synthase normalized to nmol/(min*million of cells).

Mitochondrial enzymatic activities

The activities of the mitochondrial OXPHOS complexes were measured at 37°C with a UVmc2 spectrophotometer (SAFAS, Monaco). Activity of the NADH ubiquinone reductase (CI), succinate ubiquinone reductase (CII), ubiquinol cytochrome C reductase (CIII), cytochrome C oxidase (CIV) and citrate synthase (CS) were measured according to standard methods [34].

Rotenone treatment

To determine the effect of mitochondrial complex I alteration on sensitivity to drug, we artificially decreased the complex I activity by treating MCF-7^S cells with rotenone, a specific inhibitor of complex I. For analysis of mitochondrial metabolism, MCF-7^S were plated out at 10 000 cells per cm² in 25 cm² flasks. Twenty hours after plating, MCF-7^S were treated with rotenone (50 nM). The cells were treated during 72 hours prior to mitochondrial oxygen consumption measurement. Oxygen consumption were measured by using glutamate (5 mM) and malate (5 mM) + ADP (1.5 mM). For analysis of cell viability, MCF-7^S cells were plated out at a density of 40 000 cells per well in 24-well plates. Twenty hours after plating, MCF-7^S were treated with DOX (200 nM – IC50 72 hours) and rotenone (50 nM). The cells were treated during 72 hours prior to SRB assay [sulforhodamine B]. All control conditions were treated with an equivalent volume of the

solvent control (ethanol). The tested compounds were renewed every day. Basal effects of rotenone were normalized at 100% to represent only the potentiating effect of treatment.

Hypoxia treatment

To determine the relationship between mitochondrial complex I alteration with the sensitivity to DOX, we also incubated MCF-7^S during 6 days in hypoxic chamber (SCI-Tive, Ruskinn) (1% O₂, 5% CO₂, 60% humidity at 37°C). For analysis of cell viability, MCF-7^S cells were plated at 50 000 cells per well in 24-well plates for hypoxic condition or 20 000 cells per well in 24-well plates for normoxic conditions (basal cultured conditions). Twenty hours after plating, cells were treated with DOX [0-50 nM]. The tested compounds were renewed every day. The cells were treated for 6 days prior to SRB assay [sulforhodamine B]. Basal effects of compounds were normalized at 100% to represent only the potentiating effect of treatment. For analysis of mitochondrial metabolism, cells were plated out at 500 000 cells per cm² in 25 cm² flasks for hypoxic conditions. The cells were cultivated for 6 days prior to mitochondrial oxygen consumption measurment. Oxygen consumption were measured with glutamate (5 mM) and malate (5 mM) + ADP (1.5 mM).

ROS measurement

ROS production was evaluated by measuring of hydrogen peroxide-induced fluorescence of 1 μ M of Amplex Red (exc-em: 560-584 nm - Interchim, France) in the presence of horseradish peroxidase (10 UI/mL) and superoxide dismutase (40 UI/mL) at 37°C under a constantly stirred by spectrofluorimetry (F-2500 FL, Hitachi). For measuring the mitochondrial ROS production, cells (10x10⁶) were permeabilized by digitonin (8 μ g per 10⁶ cells for MCF-7^S and 10 μ g per 10⁶ cells for MCF-7dox^R). Permeabilized cells were resuspended in ROS buffer (250 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, 2.5 mM KH₂PO₄, 20 mM TrisHCL, 2 mM MgCl₂, 0.3% BSA, pH 7.4). ROS production was measured in the presence of glutamate (5 mM) and malate (5 mM) and succinate (10 mM). MCF-7^S and MCF-7dox^R were treated during 24 hours by 5 μ M DOX before measurement.

Redox cycling of DOX

Redox cycling of DOX by complex I (one-electron reduction and reoxidation by oxygen to produce superoxide anion) was determined by monitoring oxygen consumption as previously described [35]. Briefly, permeabilized cells ($1x10^6$ cells) by exposure to digitonin (8 µg per 10^6 cells for MCF- 7^8 and 10 µg per 10^6 cells for MCF- $7dox^R$), were resuspended in the respiratory buffer (10 mM KH₂PO₄, 300 mM Mannitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA and 0.1% BSA fatty acid free, pH 7.4). Experiments were carried out with DOX (10 µM) succinate (10 mM) and antimycin A (2 µM) and redox cycling was started by adding of ATP (1.5 mM). Finally, rotenone (2.5 µM) was added to check that the site of DOX reduction was complex I. For the condition (MCF- 7^8 + rotenone), cells were treated prior measurement during 72 hours with 50 nM of rotenone.

Calcium retention capacity

For measuring of mitochondrial calcium retention capacity, MCF-7dox^R cells (10×10^{6} cells) were permeabilized with digitonin ($10 \mu g$ per 10^{6} cells). Permeabilized cells were resuspended in respiratory buffer (250 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MOPS, pH 7.4). Extra-mitochondrial Ca²⁺ was measured spectrofluorimetrically at 37°C under a constantly stirred (F-2500 FL, Hitachi), in the presence of 0.25 μ M Calcium Green-5N (with excitation and emission wavelengths set at 506 and 532 nm respectively). Measurements were performed with glutamate (5 mM) and malate (5 mM). Cells were then exposed to repeated calcium spikes (2 μ M), at constant time intervals, and fluorescence drops were used to assess mitochondrial calcium uptake. PTP opening was detected as a sudden and irreversible fluorescence increase. The concentration of calcium taken up by mitochondria before PTP opening determined the capacity of calcium retention.

DOX Cellular viability

For analysis of cell viability, MCF-7dox^R cells were plated out at a density of 40 000 cells per well in 24-well plates. Twenty hours after plating, MCF-7dox^R were treated with DOX (10 μ M – IC50 7 days) and with or without MitoTempo (10 μ M) during seven days prior to SRB assay [sulforhodamine B]. The tested compounds were renewed every day. Basal effects of MitoTempo were normalized at 100% to represent only the potentiating effect of treatment.

Assembly of mitochondrial respiratory chain complex I

Complex I assembly was analyzed by Blue Native electrophoresis (BN Page) according to [36]. Briefly, mitochondria were isolated from cells pellets by differential centrifugation (10 000g, 10 minutes, 4°C) after digitonin permeabilization. Mitochondrial complexes were solubilized in Laurylmaltoside (3g/g of proteins) and fifty micrograms of proteins were loaded and resolved in a native 4-16% acrylamide gel. Proteins were transferred to PVDF membrane in a dry transfer apparatus (Bio-Rad). Membranes were immunoblotted with antibodies raised against NDUFB6 and NDUFS2 for complex I, SDHA for complex II (used as loading reference), III core 2 for complex III and COX Va for complex IV (1/1000e, Abcam) and bands were revealed by chemiluminescence on an Odyssey apparatus (Li-Cor Biosciences). For supercomplexes detection, the same protocol was applied except to larylmatoside solubilization which was replaced with digitonin (3g/g of proteins).

Preparation of isolated mitochondria

All steps were performed at 4°C to prevent degradation. Cells were detached and cell membrane was permeabilized by exposure to digitonin (6 μ g per 10⁶ cells for MCF-7^S and 8 μ g per 10⁶ cells for MCF-7dox^R). Then, cells were resuspended in isolation buffer (0.2 mM EDTA, 0.25 M Sucrose and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) and then centrifuged at 800 x g for 10 min. The surnageant was recovered and the pellet was resuspended in isolation buffer and centrifuged at 1 000 x g for 10 min. The surnageant. The resulting surnageant was centrifuged at 12 500 x g for 15 min. The mitochondrial pellet was resuspended in isolation buffer and protein concentration was determined using BCA kit (Bicinchoninic Acid Assay - Interchim) with BSA fatty acid free used as standard.

Mitochondrial phospholipids content

Mitochondria were extracted from MCF-7^S and MCF-7dox^R cells by differential centrifugation and lipids were extracted following the protocol of Bligh and Dyer [37]. Then, lipid extracts were separated by High Performance-Thin Layer Chromatography-densitometry as previously described [33]. In order to quantify cardiolipin (CL) and monolysocardiolipin (MLCL), standards and samples were loaded on silica plates using Linomat V sample applicator (CAMAG, Muttenz Switzerland). After migration, the plates

were immersed into the following solution (10% w/v) copper sulfate in 8% (v/v) phosphoric acid solution and then heated at 160°C for 15 min to stain all of the phospholipids. Quantification was performed using Thin Layer Chromatography-visualizer Reprostar 3® and WinCats VideoScan® software (CAMAG, Muttenz Switzerland).

Cardiolipin metabolism enzymatic activities

After mitochondrial isolation of MCF-7^S and MCF-7dox^R cells, phosphatidylglycerol phosphate synthase (PGPS) enzyme activity was determined as described [38]. Cardiolipin synthase (CLS) activity was assayed exactly as described [39], except that the assay contained 0.05–0.1 mg of protein, the pH of the assay was 8.5 and the samples were sonicated for 10 s in a Branson model 1200 sonicator before incubation. Incubation was at 37 C for 60 min with [¹⁴C]PG (sp. radioactivity 45000 d.p.m./nmol). Monolysocardiolipin acyltransferase-1 (MLCL AT-1) activity was determined as described [40]. Phospholipase A2 (PLA2) activity was measured as described [41].

Western-blotting

After boiling in Laemmli buffer (20 mM Tris pH 6.8, 2 M β -Mercaptoethanol, SDS 9%, glycerol 30%), total proteins extract were resolved by SDS-PAGE, transferred to polyvinylidenefluoride membrane, blocked in 5% non-fat milk in phosphate-buffered saline (PBS)/Tween-20, blotted and developed with antibodies specific for tafazzin (gift of S. Claypool), complex I (anti GRIM19, ab110240, Abcam), β adaptine (sc-58226, Santa Cruz Biotechnology) (loading control) and β actin (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) (loading control) and β actin (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) (loading control) and β actin (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) (loading control) and detected by Fusion Fx visualizer (Vilber Lourmat). Secondary antibodies were obtained from SantaCruz. The protein band intensities were analyzed by densitometry (MultiGauge software, Fujifilm).

Cell Transfection

MCF-7^s cells were inoculated in a six-well plate at 0.5 million / well. Transfection system was prepared with serum-free Optimen medium: total volume (0.5 mL): 20 pmol of si*CLS1* (*siCLS1* siRNA (h) sc-72929) or 20 pmol of si*CT* (siRNA-A sc-37007), 5 μ L Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen, France) qsp Optimem medium without serum. After 24 hours, the media was removed and changed by 2 mL of DMEM + 5% FCS.

RNA isolation and real time PCR assay

Total RNA from MCF-7^S cells were extracted with NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel) following manufacturer's instructions. RNA yield and purity were determined by spectrophotometry and only samples with an A260/A280 ratio above 1.6 were kept for further experiments. Reverse transcription was performed using Prime ScriptTM RT Reagent Kit (Takara ClonTech). Quantifying PCR amplified sequences is carried out with the SYBR® qPCR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus, Takara), from 50 ng of cDNA in a final volume of 25 μ L with MyiQ thermocycler (BioRad). Primers (HPRT1 and CRLS1) are used at a final concentration of 160 nM. The protocol is as follows: 2 minutes at 50°C (Taq Polymerase activation), 2 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C and 30 seconds at 72°C. The relative expression of the genes is normalized to HPRT and calculated using the method 2- Δ Ct.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. Differences between groups were analyzed by Mann-Whitney test for non-paired observations or Wilcoxon signed-ranked test for two related samples. p<0.05 was considered to be statistically significant.

Results

DOX-resistant breast cancer cells were characterized by a specific metabolic phenotype

To establish the metabolic phenotype of MCF-7dox^R and MCF-7^S, we first measured glucose consumption and lactate production. The ratio of lactate production/glucose consumption was higher (+26%) in MCF-7dox^R than in MCF-7^S (p<0.01; Fig. 1A) suggesting that MCF-7dox^R cells had a glycolytic phenotype. As shown in figure 1B, MCF-7dox^R cells exhibited a lower mitochondrial oxygen consumption in basal conditions compared to MCF-7^S (-41%; p<0.05). At the whole cell level, mitochondrial oxygen consumption under basal conditions reflects coupled (the ATP demand of the cells) as well as uncoupled (energy wasting processes) consumption of oxygen. We previously found that the capacity to synthesize ATP (i.e. oxygen consumption necessary to product ATP) was more performant in mitochondria from MCF-7dox^R than in MCF-7^S since energy wasting processes were reduced (Dartier al, submitted article). In addition, we found that mitochondrial oxygen consumption coupled to ATP synthesis was not different between the two cell lines (Fig. 1C) suggesting that ATP turnover was identical. The decreased mitochondrial oxygen consumption in MCF-7dox^R could not be explained by lower mitochondrial content. The number of mitochondria as measured by transmission electron microscopy was unchanged between the two cell types (supplementary Fig. S1A). No difference in the maximal activity of citrate synthase, an other indicator of mitochondrial mass was detected (Fig. S1B). Mitochondrial oxygen consumption is also limited by the supply in substrate and the activity of respiratory chain. Since MCF-7dox^R cells presented a shift to lactate production, one possible explanation was that pyruvate flux was rerouted through lactate deshydrogenase reducing in turn the metabolic flux of pyruvate towards mitochondria. Dichloroacetate (DCA) can inhibit the activity of pyruvate dehydrogenase kinase and subsequently increase the activity of pyruvate dehydrogenase, which promotes the flux of pyruvate into mitochondria. No effect of DCA treatment on mitochondrial oxygen consumption in MCF-7dox^R was observed (Fig. 1D). This result suggested that it was not able to force the oxidation of pyruvate in the mitochondria suggesting that oxidation of pyruvate was limited at the respiratory chain level in

mitochondria of MCF-7dox^R. Collectively, the data showed that MCF-7dox^R have a specific metabolic phenotype since anaerobic glycolysis was increased and mitochondria were limited to oxidize pyruvate but not defective in producing ATP.

Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in DOX-resistant breast cancer cells

To explore the reason of the limiting mitochondria pyruvate oxidation in MCF-7dox^{R,} we analyzed the integrity of the respiratory chain complexes by measuring the maximal enzymatic activities of respiratory chain complexes. Activities of complex I and complex IV were ~ 50% lower in MCF-7dox^R compared to MCF-7^S (p<0.005). By contrast, activity of complex II was higher (2.5 fold; p<0.005). No change of complex III was observed (Fig. 2A). We next analyzed the effects of these changes on the intrinsic respiratory chain activity by measuring substrate-driven mitochondria oxygen consumption in digitonin-permeabilized cells under ATP synthesis condition. Compared MCF-7^S, mitochondrial oxygen consumption in MCF-7dox^R with complex I- (glutamate/malate; -33%; p<0.05), complex II- (succinate; -52%; p<0.01) or complex IV-linked substrate (TMPD/ascorbate; -44%; p<0.005; Fig. 2B) was reduced. Collectively, these data showed that changes in activity of complexes I and IV were the only one to affect the whole respiratory chain activity in MCF-7dox^R.

Reduction of respiratory chain complex I activity was associated to DOX-resistance in breast cancer cells

Mitochondrial complex I plays a pivotal role in ROS production, PTP-linked cell death and the redox cycling of DOX. To determine the potential relationship between the resistance to DOX and the lower activity of complex I observed in MCF-7dox^R, we directly tested sensitivity of MCF-7^S to DOX in presence of rotenone a specific inhibitor of mitochondrial complex I. Pretreatment of MCF-7^S with rotenone reduced mitochondrial oxygen consumption in digitonin-permeabilized cells under ATP synthesis condition (-37%; p<0.05; Fig. 3A). The inhibition of complex I was associated with a decrease in DOX efficacy, as observed by cell viability assays (Fig.3B). Rotenone decreased DOX efficacy by ~20 % (p<0.01). Because hypoxia in solid tumors is known to decrease OXPHOS and

is involved in drug resistance, we measured activity of complex I and cell sensibility to DOX under 1% oxygen for 6 days. Complex I-driven mitochondrial oxygen consumption was decreased (-54%) in hypoxic conditions compared to normoxic conditions (p<0.005; Fig. 3C). This decrease in complex I-driven oxygen consumption was associated with a decrease in DOX efficacy since IC50 shifted from 16.5 \pm 2.9 in normoxic conditions to 19.5 \pm 1.6 nM in hypoxic conditions (+18%; p<0.005; Fig. 3D). This effect closely resembled to that of inhibition of complex I activity by rotenone (see Fig. 3B). Collectively, our data showed that inhibition of respiratory chain complex I was associated to a lower sensitivity to DOX in MCF-7^S.

Reduction of respiratory chain complex I activity down modulated DOX-induced opening of mitochondrial PTP in DOX-resistant breast cancer cells

Mitochondrial respiratory chain complex I is one of the main source of ROS. Moreover, DOX is a redox active compound that can react with complex I to generate semiguinone radical and high levels of ROS [23]. To verify whether the decrease in complex I activity resulted in a lower one-electron reduction of DOX and re-oxidation (redox cycling) to produce superoxide anion, we monitored oxygen consumption in the presence of DOX as previously described [35]. Under such a condition, oxygen consumption is due to the reduction of molecular oxygen to superoxide anion by DOX semiquinone form. Oxygen consumption in the presence of DOX tended to be higher in MCF-7^s than in MCF-7dox^R (p=0.057; Fig. 4A). Interestingly, the treatment of MCF7^s by rotenone led to a reduction of oxygen consumption as the same extent as that in observed in MCF-7^R (p=0.063; Fig. 4A) suggesting that the decrease in complex I activity was associated to a lower redox cycling. In addition, we found that when cells were treated with DOX for 48h, mitochondrial ROS production was greater in MCF-7^S compared to MCF-7dox^R (+20%; p<0.005; Fig. 4B). Since ROS modulate PTP opening, we hypothesized that the decrease in DOXinduced ROS production, as a result of the lower activity of complex I, down modulated PTP opening and in turn decreased cell death in MCF-7dox^R. We performed a whole-cell Ca²⁺ retention capacity assay, which measures the Ca²⁺ threshold for PTP opening in permeabilized cells exposed to repeated Ca²⁺ pulses as mitochondrial Ca²⁺ accumulation induced the PTP. DOX treatment inhibited (+25%) the PTP opening in MCF-7dox^R (p<0.05; Fig. 4C). On the contrary, ROS production caused by a xanthine-xanthine
oxidase reaction induced PTP opening in MCF-7dox^R (p<0.05; Fig. 4D). This suggested that MCF-7dox^R were sensitive to an exogenous source of ROS but were protected from DOX-induced oxidative stress. Moreover, we could noticed that toxicity of 72h treatment with DOX was partly abolished by the mitochondria-targeted antioxidant MitoTEMPO suggesting that mitochondrial oxidative stress was involved in this effect (p<0.01; Fig. 4E). Collectively, the data suggested that the decrease activity of respiratory chain complex I partly protected MCF-7dox^R from the negative effects of DOXinduced mitochondrial oxidative stress by lowering redox cycling of the drug and the ensuing PTP opening.

Complex I was not correctly assembled and the quantity of supercomplexes was reduced in DOX-resistant breast cancer cells

We further analyzed the origin of reduction in activity of respiratory chain complex I in MCF-7dox^R. This was not associated to the presence of pathogenic mutation in mitochondrial DNA (mtDNA) investigated by whole mtDNA sequencing by next generation sequencing (data not shown). Interestingly, we found a significant reduction of the quantity of complex I holoenzyme (fully assembled complex I) in MCF-7dox^R compared to MCF-7^S (-71%, p<0.05; Fig. 5A). No assembly intermediates could be evidenced in MCF-7dox^R cells. The strong reduction in complex I holoenzyme would rather be linked to an assembly defect than to a decreased expression of complex I subunits since the quantity of GRIM19 (an accessory complex I subunit) was not decreased in MCF-7dox^R (Fig. 5B). Moreover, the quantity of supercomplexes I+III2+IV was also reduced in MCF-7dox^R compared to MCF-7^S (-76%, p<0.01; Fig. 5C). These results suggested that complex I holoenzyme quantity was the limitating factor for the formation of supercomplexes structures in MCF-7dox^R. Altogether our data showed that complex I was not correctly assembled and the quantity of supercomplexes was reduced in MCF-7dox^R.

Cardiolipin metabolism was altered in DOX-resistant breast cancer cells

Due to their localization to the inner mitochondrial membrane, cardiolipin (CL) is critical for optimal activity of respiratory chain complex I [42]. CL content was reduced in MCF-7dox^R (-57%; p<0.01; Fig. 6A) while a strong accumulation of monolysocardiolipin

(MLCL), an immature intermediate with three fatty acids chain was observed (3-fold increase p<0.05; Fig. 6B). To analyze the origin of changes in CL and MLCL content, we investigated the main enzyme involved in CL biosynthesis and remodeling. CL synthase activity was lower (-29%; p<0.01; Fig. 6C) in MCF-7dox^R. On the contrary, PGPS, PLA2 and MLCAT activities were not different between the two cell lines (Fig. S3A, B and C). In addition, content of tafazzin (TAZ) protein, one of the main enzyme regulating CL remodeling, was reduced (-38%; p<0.05; Fig. 6D) in MCF-7dox^R compared to MCF-7^S. To determine the relationship between CL and complex I alteration CL synthase gene was knocked down in MCF-7^S using a siRNA transfection technique. CL synthase mRNA was reduced by 82% in siCLS compared to siCTL cells (p<0.005; Fig. 6E). Mitochondrial oxygen consumption in the presence of substrates of complex I tended to be lower in CLS siRNA transfected MCF-7^S (p=0.058; Fig. 6F).

Discussion

In the present study, we report a role for mitochondrial complex I in DOX resistance in breast cancer cells that is associated to a perturbation in cardiolipin (CL) metabolism. Mitochondrial complex I activity was decreased in MCF-7dox^R due to a defective assembly of complex I and a decreased quantity of supercomplexes. By lowering the redox cycling of DOX and the resulting production of superoxide anion, inhibition of complex I activity was associated to a delay in DOX-induced opening of PTP. In addition, cell death induced by DOX was decreased by inhibition of activity of complex I in the sensitive cell line MCF-7^S. Finally, the decreased mitochondrial complex I activity was associated to a perturbation in cardiolipin synthesis and remodeling resulting in a lower quantity of CL and an accumulation of MLCL, the immature form of CL.

Metabolic properties of cancer cells are now regarded as a hallmark of cancer and a novel molecular target to develop therapeutic strategies [43]. However, the precise mechanisms underlying the association between the metabolic phenotype (oxidative phosphorylation vs glycolysis) and the sensitivity of cancer cells to anticancer drugs remain largely discussed, especially in breast cancer. Contrary to initial Warburg's hypothesis, mitochondria are not systematically dysfunctional in cancer cells [3], [4]. Indeed, it has been showed that several tumors derive most of their ATP from mitochondrial oxidative phosphorylation [44]. In the present study, we found that MCF-7dox^R had a particular metabolic phenotype since glycolysis was increased and their mitochondria were characterized by decreased activity of complex I while they were able to synthesize ATP efficiently (i.e. they consume a lower quantity of oxygen to synthesize the same amount of ATP). In addition to our previous data (Dartier et al, submitted article) showing that mitochondrial efficiency of ATP synthesis in MCF-7dox^R is similar to that measured in noncancer cells [45], the present study therefore reinforce the idea that mitochondria of cancer cells are not necessarily defective in producing ATP. Interestingly, we previously found that the higher efficiency of ATP synthesis observed in MCF-7dox^R was associated to a two-fold lower mitochondrial accumulation of DOX in comparison to MCF-7^S (Dartier et al, submitted article). Moreover, we reported that depletion of mitochondrial energy led a decreased activity of ATP-dependent efflux pumps identified in the mitochondrial membrane of MCF-7dox^R and involved in multi-drug

resistance phenotype. Change in slip redox (i.e. change in H⁺/e⁻ stoechiometry) in the proton pumps (mitochondrial complexes I, III and IV) are among the mechanisms able to control mitochondrial efficiency of ATP synthesis. However, so far, a slipping redox has only been reported for mitochondrial complex IV in physiological or pathological situations. Thus, it has been shown that partial inhibition of mitochondrial complex IV was associated to a higher mitochondrial efficiency of ATP synthesis by decreasing the slipping in the proton pump [46], [47].

An important data of the present study is that mitochondrial complex I seems to be involved in DOX resistance in MCF-7dox^R. Indeed, we found 1) that activity of mitochondrial complex I was lower in MCF-7dox^R in comparison to MCF-7^S, 2) reduction of DOX by complex I and the ensuing production of ROS (due to redox cycling of DOX) were decreased in MCF-7dox^R, 3) opening of PTP induced by DOX, with complex I substrates, was reduced in MCF-7dox^R, and 4) inhibition of complex I by rotenone or by hypoxia led to a decreased cell death induced by DOX in MCF-7^S. It has been recently found that SERPINB3, a serine protease, was able to decrease cisplatin- or DOX-induced cell death in hepatoma cells by inhibiting enzymatic activity of mitochondrial respiratory complex I, ROS production by complex I and the ensuing PTP opening [48]. It has been suggested that a reduced sensitivity of PTP opening to diverse stress stimuli could be a strategy used by cancer cells to avoid death [49], [50]. In the present study, ROS induced by xanthine/xanthine oxidase stimulated opening of PTP in MCF-7dox^R. In addition, we found that ROS induced by xanthine/xanthine oxidase stimulated opening of PTP in MCF-7dox^R at the same extent than in MCF-7^S (data not shown) This suggests that protection of PTP opening from oxidative damage through inhibition of mitochondrial complex I in MCF-7dox^R was restricted to oxidative damage induced by DOX/chemotherapeutics or could be overcome by a more important level of ROS production. Therefore, complex I rather than PTP was the main target involved in DOX resistance in MCF-7dox^R. In the present study, the decrease activity of mitochondrial complex I was associated to a defective assembly of this complex and a decreased quantity of supercomplexes composed by complexes I, III and IV. It has been already suggested that complex I seemed essential in the formation of supercomplexes [51]. Moreover, it has also been shown that the reduction of mitochondrial oxygen consumption in K-ras transformed cells was associated to a lower complex I activity due to a destabilization of supercomplexes composed by complex I, III and V4 [52]. Mitochondrial complex I is compounded of 45 subunits and a well-functioning of this complex relies on a coordinated and sequential assembly process of these subunits into a complex I holoenzyme [53]. An optimal functioning of the respiratory chain implies also a supramolecular assembly of these complexes [54]. To our knowledge, our data are the first to describe mitochondrial complexes assembly and supercomplexes formation in the context of chemoresistance. Understanding the interplay between complex I assembly, supercomplexes and DOX resistance in MCF-7dox^R could therefore bring very important knowledge in the global understanding of the molecular mechanisms involved in chemoresistance.

The other important data in the present study is that CL metabolism is particular in MCF-7dox^R. Indeed, CL content was reduced and MLCL, the immature and the precursor form of CL (a phospholipid with three fatty acid chains) was increased in MCF-7dox^R. CL is considered as the signature phospholipid of mitochondria and alterations in CL content, fatty acid composition and/or CL peroxidation have been associated with mitochondrial dysfunction in multiple tissues in several physiopathological conditions [27]. For instance, we have recently shown that an increase in CL content in liver mitochondria triggered a decrease in the efficiency of mitochondrial ATP synthesis in a rat model of cancer cachexia [55], [56]. Complex I contains tightly bound CL and CL is required for the structural integrity of the complex I [57]. One of the possible mechanisms of DOX-induced cardiotoxicity is the production of ROS through the redox cycling leading to oxidative stress partly due to the formation of a strong DOX-CL complex [28], [29]. In addition, it has been shown that CL content deficiency was associated to a lower oxidative stressinduced cell death in response to DOX in B-lymphocytes [31]. To our knowledge regarding the drug resistance phenotype in breast cancer cells only one study reported an increase of CL content in MCF-7 doxorubicin resistant and cisplatin-resistant cancer cells, as compared to drug-sensitive parental cells [58]. However in this study, MLCL content was not determined. An accumulation of MLCL and a reduction in CL content has been reported in the cardioskeletal myopathy known as Barth syndrome [59]. Barth Syndrome results in unstable respiratory chain supercomplexes and in a reduction of Complex I holoenzyme levels [60]. However, the molecular basis underlying the pathology of Barth Syndrome is not understood and what is the more important between decreased CL and increased content needs to be determined and the functions of CL remodeling are just beginning to be explored [61]. To our knowledge, the present study, it is the first study reporting an accumulation of MLCL in cancer cells. In this study, we

examined activities of the main enzymes involved in CL biosynthesis and remodeling. CL synthase and tafazzin were strongly reduced in MCF-7dox^R. CL synthase catalyses the final step of CL synthesis. At this step CL is considered as nascent and will undergomaturation by fatty acyl remodeling. After deacylation by phospholipase A2 producing MLCL, it is remodeled in mature CL, in part by transacylase tafazzin (TAZ). The precise mechanisms binding CL metabolism abnormalities and the involvement of complex I in DOX resistance of MCF-7dox^R needs further experiments, in particular the specific role played by MLCL compared to CL.

In conclusion, in this study, we have found 1) activity of mitochondrial complex I was decreased in MCF-7dox^R due to a defective assembly of complex I and a decreased quantity of supercomplexes, 2) by lowering the redox cycling of DOX and the resulting production of superoxide anion, inhibition of complex I activity was associated to a delay in DOX-induced opening of PTP, 3) cell death induced by DOX was decreased by inhibition of activity of complex I in MCF-7^S and 4) the decrease in complex I activity was associated to a lower quantity of CL and a higher content of MLCL, the immature form of CL, in MCF-7dox^R. Our data support a role for mitochondrial respiratory chain complex I and cardiolipin metabolism in DOX resistance in breast cancer cells.

Acknowledgements

Julie Dartier received a fellowship from "Région Centre". This project was supported by grants from "Région Centre" ("APR IR Mitochimio" and LIPIDS project of ARD2020-Biomedicaments) and "Ligue Nationale contre le Cancer (CD37 et CD85)", France.

References

- J. Ferlay, H.R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin, Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, Int. J. Cancer, 127 (2010) 2893–2917.
- [2] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, Pharmacol. Rev., 56 (2004) 185–229.
- [3] O. WARBURG, On respiratory impairment in cancer cells, Science, 124 (1956) 269–70.
- [4] O. WARBURG, On the origin of cancer cells, Science, 123 (1956) 309–14.
- [5] W.H. Koppenol, P.L. Bounds, C. V Dang, Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism, Nat. Rev. Cancer, 11 (2011) 325–37.
- [6] R. Moreno-Sánchez, S. Rodríguez-Enríquez, A. Marín-Hernández, E. Saavedra, Energy metabolism in tumor cells, FEBS J., 274 (2007) 1393–1418.
- S. Rodríguez-Enríquez, J.C. Gallardo-Pérez, A. Avilés-Salas, A. MarínHernández, L. Carreño-Fuentes, V. Maldonado-Lagunas, R. Moreno-Sánchez, Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids, J. Cell. Physiol., 216 (2008) 189–197.
- [8] M. Fanciulli, T. Bruno, A. Giovannelli, F.P. Gentile, M. Di Padova, O. Rubiu, A. Floridi, Energy metabolism of human LoVo colon carcinoma cells: Correlation to drug resistance and influence of Ionidamine, Clin. Cancer Res., 6 (2000) 1590–1597.
- [9] E. Hulleman, K.M. Kazemier, A. Holleman, D.J. VanderWeele, C.M. Rudin, M.J.C. Broekhuis, W.E. Evans, R. Pieters, M.L. Den Boer, Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells, Blood, 113 (2009) 2014–2021.
- [10] D.J. Kominsky, J. Klawitter, J.L. Brown, L.G. Boros, J. V. Melo, S.G. Eckhardt, N.J. Serkova, Abnormalities in glucose uptake and metabolism in imatinibresistant human BCR-ABL-positive cells, Clin. Cancer Res., 15 (2009) 3442–3450.

- [11] J. Kluza, M. Jendoubi, C. Ballot, A. Dammak, A. Jonneaux, T. Idziorek, S. Joha,
 V. Dauphin, M. Malet-Martino, S. Balayssac, P. Maboudou, G. Briand, P.
 Formstecher, B. Quesnel, P. Marchetti, Exploiting mitochondrial dysfunction for
 effective elimination of imatinib-resistant leukemic cells, PLoS One, 6 (2011) 1–
 14.
- [12] Y. Zhou, F. Tozzi, J. Chen, F. Fan, L. Xia, J. Wang, G. Gao, A. Zhang, X. Xia,
 H. Brasher, W. Widger, L.M. Ellis, Z. Weihua, Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells, Cancer Res., 72 (2012) 304–314.
- [13] D. Tello, E. Balsa, B. Acosta-Iborra, E. Fuertes-Yebra, A. Elorza, A. Ordóñez,
 M. Corral-Escariz, I. Soro, E. López-Bernardo, E. Perales-Clemente, A. MartínezRuiz, J.A. Enríquez, J. Aragonés, S. Cadenas, M.O. Landázuri,
 Induction of the mitochondrial NDUFA4L2 protein by HIF-1α decreases oxygen
 consumption by inhibiting complex i activity, Cell Metab., 14 (2011) 768–779.
- P. Wang, M. Song, Z. Zeng, C. Zhu, W. Lu, J. Yang, M. Ma, A. Huang, Y. Hu,
 P. Huang, Identification of NDUFAF1 in mediating K-Ras induced mitochondrial dysfunction by a proteomic screening approach, Oncotarget, 6 (2015) 3947–3962.
- [15] L. Galluzzi, J.M. Bravo-San Pedro, G. Kroemer, Organelle-specific initiation of cell death pathways, Nat. Cell Biol., 3 (2001) E255–E263.
- [16] M. Crompton, A. Costi, Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca2+, inorganic phosphate and oxidative stress A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca2+ overload, Eur. J. Biochem., 178 (1988) 489–501.
- [17] A. Rasola, P. Bernardi, The mitochondrial permeability transition pore and its adaptive responses in tumor cells, Cell Calcium, 56 (2014) 437–445.
- [18] C.P. Baines, R.A. Kaiser, N.H. Purcell, N.S. Blair, H. Osinska, M.A. Hambleton,
 E.W. Brunskill, M.R. Sayen, R.A. Gottlieb, G.W. Dorn, J. Robbins, J.D.
 Molkentin, Mitochondrial permeability: dual role for the ADP/ATP translocator?,
 Nature, 430 (2004) 1 p following 983.

- [19] C. Chauvin, F. De Oliveira, X. Ronot, M. Mousseau, X. Leverve, E. Fontaine, Rotenone Inhibits the Mitochondrial Permeability Transition-induced Cell Death in U937 and KB Cells, J. Biol. Chem., 276 (2001) 41394–41398.
- [20] B. Li, C. Chauvin, D. De Paulis, F. De Oliveira, A. Gharib, G. Vial, S. Lablanche, X. Leverve, P. Bernardi, M. Ovize, E. Fontaine, Inhibition of complex 1 regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D, Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg., 1817 (2012) 1628–1634.
- [21] D. Detaille, B. Guigas, C. Chauvin, E. Fontaine, N. Wiernsperger, X. Leverve, Transition-Dependent Process, 54 (2005) 2179–2187.
- [22] D. Han, E. Williams, E. Cadenas, Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space, Biochem. J., 353 (2001) 411–6.
- [23] E. Cadenas, K.J. Davies, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, Free Radic Biol Mes, 23 (2000) 222-30.
- [24] J.M. Berthiaume, K.B. Wallace, Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity, Cell Biol Toxicol, 23 (2007) 15–25.
- [25] S.M. Claypool, C.M. Koehler, The complexity of cardiolipin in health and disease, Trends Biochem Sci., 37 (2012) 32-41.
- [26] G. Petrosillo, G. Casanova, M. Matera, F.M. Ruggiero, G. Paradies, Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: Induction of permeability transition and cytochrome c release, FEBS Lett., 580 (2006) 6311– 6316.
- [27] G. Paradies, V. Paradies, F.M. Ruggiero, G. Petrosillo, Cardiolipin and mitochondrial function in health and disease, Antioxid Redox Signal, 20 (2014) 1925–1953Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F.
- [28] E. Goormaghtigh, P. Chatelain, J. Caspers, J.M. Ruysschaert, Evidence of a specific complex between Adriamycin and negatively charged phosphlipids, Biochim. Biophys. Acta, 597 (1980) 1–14.
- [29] E. Goormaghtigh, P. Chatelain, J. Caspers, J.M. Ruysschaert, Evidence of a complex between adriamycin derivatives and cardiolipin: Possible role in cardiotoxicity, Biochem. Pharmacol., 29 (1980) 3003–3010.

- [30] E. Goormaghtigh, P. Huart, M. Praet, R. Brasseur, J.M. Ruysschaert, Structure of the adriamycin-cardiolipin complex Role in mitochondrial toxicity, Biophys. Chem., 35 (1990) 247–257.
- [31] B. Aryal, V.A. Rao, Deficiency in Cardiolipin Reduces Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in Human B-Lymphocytes, PLoS One, 11 (2016) e0158376.
- [32] C.R. Fairchild, S.P. Ivy, J. Whang-peng, N. Rosen, M.A. Israel, P.W. Melera, K.H. Cowan, M.E. Goldsmith, resistant Human Breast Cancer Cells, 8 (1987) 5141–5148.
- [33] L. Peyta, K. Jarnouen, M. Pinault, C. Coulouarn, C. Guimaraes, C. Goupille, J.P.P. De Barros, S. Chevalier, J.F. Dumas, F. Maillot, G.M. Hatch, P. Loyer, S. Servais, Regulation of hepatic cardiolipin metabolism by TNFα: Implication in cancer cachexia, Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids, 1851 (2015) 1490–1500.
- [34] F. Medja, S. Allouche, P. Frachon, C. Jardel, M. Malgat, B.M. de Camaret, A. Slama, J. Lunardi, J.P. Mazat, A. Lombès, Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis, Mitochondrion, 9 (2009) 331–339.
- [35] J.H. Doroshow, K.J.A. Davies, Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria II Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical, J. Biol. Chem., 261 (1986) 3068–3074.
- [36] G. Leman, N. Gueguen, V. Desquiret-Dumas, M.S. Kane, C. Wettervald, S. Chupin, A. Chevrollier, A.S. Lebre, J.P. Bonnefont, M. Barth, P. Amati-Bonneau, C. Verny, D. Henrion, D. Bonneau, P. Reynier, V. Procaccio, Assembly defects induce oxidative stress in inherited mitochondrial complex I deficiency, Int. J. Biochem. Cell Biol., 65 (2015) 91–103.
- [37] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol., 37 (1959) 911–917.
- [38] G.M. Hatch, G. McClarty, Regulation of cardiolipin biosynthesis in H9c2 cardiac myoblasts by cytidine 5'-triphosphate, J. Biol. Chem., 271 (1996) 25810–25816.
- [39] M. Schlame, K.Y. Hostetier, Mammalian cardiolipin biosynthesis, Methods Enzymol., 209 (1992).

- [40] W.A. Taylor, G.M. Hatch, Identification of the human mitochondrial linoleoylcoenzyme A monolysocardiolipin acyltransferase (MLCL AT-1), J. Biol. Chem., 284 (2009) 30360–71.
- [41] Y.J. Jiang, Stimulation of cardiac cardiolipin biosynthesis by PPAR activation, J. Lipid Res., 45 (2003) 244–252.
- [42] G. Paradies, G. Petrosillo, M. Pistolese, F.M. Ruggiero, Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage, Gene, 286 (2002) 135–141.
- [43] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, Cell, 144 (2011) 646–674.
- [44] X.L. Zu, M. Guppy, Cancer metabolism: Facts, fantasy, and fiction, Biochem.Biophys. Res. Commun., 313 (2004) 459–465.
- [45] T. Cocco, C. Pacelli, P. Sgobbo, G. Villani, Control of OXPHOS efficiency by complex I in brain mitochondria, Neurobiol. Aging, 30 (2009) 622–629.
- [46] P. Clerc, M. Rigoulet, X. Leverve, E. Fontaine, Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency, J. Bioenerg. Biomembr., 39 (2007) 158–166.
- [47] M.A. Piquet, V. Nogueira, A. Devin, B. Sibille, C. Filippi, E. Fontaine, M. Roulet,
 M. Rigoulet, X.M. Leverve, Chronic ethanol ingestion increases efficiency of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria, FEBS Lett., 468 (2000) 239–242.
- [48] F. Ciscato, M. Sciacovelli, G. Villano, C. Turato, P. Bernardi, A. Rasola, P. Pontisso, SERPINB3 protects from oxidative damage by chemotherapeutics through inhibition of mitochondrial respiratory complex I, Oncotarget, 5 (2014) 2418–27.
- [49] A. Rasola, M. Sciacovelli, B. Pantic, P. Bernardi, NIH Public Access, 584 (2011) 1989–1996.
- [50] A. Rasola, P. Bernardi, Mitochondrial permeability transition in Ca2+-dependent apoptosis and necrosis, Cell Calcium, 50 (2011) 222–233.
- [51] J. Arenas, A. Barrientos, C. Ugalde, NIH Public Access, 15 (2013) 324–335.
- [52] A. Baracca, F. Chiaradonna, G. Sgarbi, G. Solaini, L. Alberghina, G. Lenaz, Mitochondrial Complex I decrease is responsible for bioenergetic dysfunction in

K-ras transformed cells, Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg., 1797 (2010) 314– 323.

- [53] M. Mimaki, X. Wang, M. McKenzie, DR. Thorburn, MT. Ryan, Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease, Biochim. Biophys. Acta - Bioerneg., 1817 (2012) 851-62.
- [54] G. Lenaz, G. Tioli, AI. Falasca, ML. Genova, Complex I function in mitochondrial supercomplexes, Biochim. Biophys. Acta - Bioernerg., 1587 (2016) 991-1000.
- [55] J.F. Dumas, C. Goupille, C.M. Julienne, M. Pinault, S. Chevalier, P. Bougnoux,
 S. Servais, C. Couet, Efficiency of oxidative phosphorylation in liver mitochondria is decreased in a rat model of peritoneal carcinosis, J. Hepatol., 54 (2011) 320– 327.
- [56] C.M. Julienne, M. Tardieu, S. Chevalier, M. Pinault, P. Bougnoux, F. Labarthe, C. Couet, S. Servais, J.-F. Dumas, Cardiolipin content is involved in liver mitochondrial energy wasting associated with cancer-induced cachexia without the involvement of adenine nucleotide translocase, Biochim. Biophys. Acta -Mol. Basis Dis., 1842 (2014) 726–733.
- [57] M.S. Sharpley, R.J. Shannon, F. Draghi, J. Hirst, Interactions between Phospholipids and NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) from Bovine Mitochondria, Biochemistry., 45 (2006) 241-8.
- [58] I.N. Todor, N.Y. Lukyanova, V.F. Chekhun, The lipid content of cisplatin- and doxorubicin- resistant MCF-7 human breast cancer cells, Exp. Oncol., 34 (2012) 97–100.
- [59] K.D. Hauff, G.M. Hatch, Cardiolipin metabolism and Barth Syndrome, Prog. Lipid Res., 45 (2006) 91–101.
- [60] M. McKenzie, M. Lazarou, D.R. Thorburn, M.T. Ryan, Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes Are Destabilized in Barth Syndrome Patients, J. Mol. Biol., 361 (2006) 462–469.
- [61] C. Ye, Z. Shen, M.L. Greenberg, Cardiolipin remodeling: a regulatory hub for modulating cardiolipin metabolism and function, J Bioenerg Biomembr., 6 (2015) 356–372.

Figures legends

Figure 1: DOX-resistant breast cancer cells were characterized by a specific metabolic phenotype. (A) Mitochondrial ratio lactate production/glucose consumption (n=5). Mitochondrial oxygen consumption measurements were performed on whole cells. (B) Mitochondrial oxygen consumption in basal conditions (n=7). (C) Mitochondrial oxygen consumption linked to ATP synthesis. (D) Mitochondrial oxygen consumption in basal conditions in MCF-7dox^R cells not treated (control) or treated (+DCA) by DCA during 72 hours (n=7). The data are presented as mean \pm SEM. * p<0.05, ** p<0.01.

Figure 2: Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in DOXresistant breast cancer cells. (A) Enzymatic activities of respiratory chain complexes I, II, III or IV (n=6). Mitochondrial oxygen consumption measured on permeabilized cells using (B) glutamate + malate (complex I, n=5), succinate (complex II, n=6), TMPD + ascorbate (complex IV, n=9) as substrates. MCF-7^S cells (black bars) and MCF-7dox^R cells (white bars). The data are presented as mean \pm SEM. ** p<0.01, *** p<0.005.

Figure 3: Reduction of respiratory chain complex I activity was associated to DOX-resistance in breast cancer cells. Measurements were performed on MCF-7^S cells. (A) Mitochondrial oxygen consumption related to ATP synthesis with (rotenone) or without (control) rotenone during 72 hours (n=8). (B) Cellular viability. Cells were not treated (control) or treated (DOX) by 200 nM DOX or by 200 nM DOX + 50 nM rotenone (DOX + rotenone) during 72 hours (n=7). (C) Complex I-driven mitochondrial oxygen consumption in normoxic or hypoxic conditions, with glutamate + malate as substrates (n=13). (D) Cellular viability. Cells were treated by DOX during 6 days in normoxic (black line) or hypoxic (red line) conditions (n=9). The data are presented as mean \pm SEM. *p<0.05, *** p<0.005.

Figure 4: Reduction of respiratory chain complex I activity down modulated DOX-induced opening of mitochondrial PTP in DOX-resistant breast cancer cells. (A) Mitochondrial oxygen consumption induced by redox cycling of DOX. Cells were treated with 10 μ M of DOX and without or with 50 nM of rotenone for 72 hours (n=4 for MCF-7^S and MCF-7dox^R with DOX and n=5 for MCF-7^S with DOX + rotenone). (B) Mitochondrial ROS production. MCF-7^S were treated with 45 nM of DOX and MCF-7doxR were treated with 10 μ M of DOX, for 48 hours (n=6). (C) Mitochondrial calcium retention capacity of MCF-7dox^R without (control) or with 10 μ M of DOX during measurement (DOX) (n=5). (D) Mitochondrial calcium retention capacity of MCF-7dox^R withine oxidase during measurement (n=6). (E) MCF-7dox^R cellular viability. Cells were treated without (control), with 10 μ M of DOX and 10 μ M of MitoTEMPO (DOX + MitoTEMPO) during seven days (n=5). The data are presented as mean ± SEM. * p<0.05, ** p<0.01.

Figure 5: Complex I was not correctly assembled and the quantity of supercomplexes was reduced in DOX-resistant breast cancer cells. (A) BN Page of holoenzyme for mitochondrial complex I, II, III and IX and content of complex I holoenzyme / content of complex II holoenzyme ratio in MCF-7^s and MCF-7dox^R. **(B)** Quantity of complex I subunits (GRIM19). **(C)** Supercomplexes content. The data are presented as mean ± SEM. * p<0.05, **p<0.01.

Figure 6: Cardiolipin metabolism was altered in DOX-resistant breast cancer cells. Measurements were performed on isolated mitochondria from MCF-7^S and MCF-7dox^R cells. Mitochondrial content of (A) cardiolipin (CL) content (n=7) and (B) monolysoCL (MLCL) (n=7). (C) Cardiolipin synthase (CLS) enzymatic activity (n=5). (D) Tafazzin protein expression (n=8). (E) CLS mRNA expression in MCF-7^S cells treated by *siCLS1* siRNA (siCLS1) or by si*CT* siRNA-A (siControl) (n=6). (F) Complex I-driven mitochondrial oxygen consumption in MCF-7^S cells treated by *siCLS1* siRNA (siCLS1) or by si*CT* siRNA-A (siControl) (n=6). (F) Complex (siCLS1) or by si*CT* siRNA-A (siControl) (n=6). The data are presented as mean \pm SEM. * p<0.05, ** p<0.01.

Supplementary data

Figure S1: Mitochondrial Content. (A) Mitochondrial number determined by transmission electron microscopy in MCF-7^S and MCF-7dox^R (n=4, 10 cells/n). **(B)** Citrate synthase activity in MCF-7^S and MCF-7dox^R (n=6). The data are presented as mean \pm SEM.

Figure S2: Cardiolipin metabolism was altered in DOX-resistant breast cancer

cells. Measurements were performed on isolated mitochondria from MCF-7^S and MCF-7dox^R cells. Enzymatic activities of **(A)** phosphatidylglycerol phosphate synthase (PGPS) (n=5). **(B)** Phospholipase A2 (PLA2) (n=5). **(C)** Monolysocardiolipin acyltransferase-1 (MLCL AT-1) (n=5). The data are presented as mean \pm SEM.



Lactate / Glucose ratio

Figure 1 : DOX-resistant breast cancer cells were characterized by a specific metabolic phenotype



Figure 2 : Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in DOX-resistant breast cancer cells



В



Figure 3 : Reduction of respiratory chain complex I activity was associated to DOX-resistance in breast cancer cells



p=0.00157

Figure 4 : Reduction of respiratory chain complex I activity down modulated DOX-induced opening of mitochondrial PTP in DOX-resistant breast cancer cells



Е



Figure 5 :Complex I was not correctly assembled and the quantity of supercomplexes was reduced in DOX-resistant breast cancer cells







MCF-7^S

Supplementary data figure S1



Supplementary data figure S2

0

MCF-7^S



MCF-7dox^R

La réduction de l'activité du complexe IV mitochondrial ne semble pas être associée à la résistance des cellules MCF-7dox.

Afin d'étudier la possible relation entre la résistance à la doxorubicine et la diminution de l'activité du complexe IV observée dans les cellules MCF-7dox (résultats article 1), nous avons directement testé l'effet d'une inhibition de ce complexe à l'aide de cyanure de potassium (KCN) sur la consommation d'oxygène et la viabilité des cellules MCF-7.



Figure 35 : Consommation d'oxygène mitochondriale dans les cellules MCF-7 après un prétraitement de 72h à l'aide d'un inhibiteur du complexe IV (KCN 20 μ M). Mesure de la consommation d'oxygène sur cellules perméabilisées des cellules MCF-7 prétraitées ou non avec du KCN (20 μ M) pendant 72h. Substrats respiratoires : Succinate (10 mM) + ADP (1,5 mM). N=10, moyenne ± SEM, (Mann-Whitney).

Figure 36 : Effet de l'inhibition du complexe IV sur la sensibilité des cellules MCF-7 à la doxorubicine après un prétraitement de 72h par le KCN. Les cellules MCF-7 sont traitées avec 200 nM de doxorubicine (DOX) en combinaison ou non avec 20 μ M de KCN. Les résultats sont exprimés en % de viabilité par rapport au témoin approprié. N = 7, moyenne ± SEM, (Mann-Whitney).

Nos résultats montrent qu'un prétraitement pendant 72h des cellules MCF-7 à l'aide de KCN (inhibiteur du complexe IV) entraine une diminution significative de la consommation d'oxygène liée à la synthèse d'ATP dans ces cellules (-21%, p<0,05, **Figure 35**). En revanche, cette inhibition du complexe IV ne semble pas entrainer d'effet supplémentaire sur la sensibilité des cellules MCF-7 à la doxorubicine **Figure 36**. Ces résultats suggèrent que la diminution de l'activité du complexe IV observée dans les cellules MCF-7dox ne semble pas participer à leur résistance à la doxorubicine.

La réduction concomitante de l'activité des complexes I et IV mitochondriaux semble être associée à la résistance des cellules MCF-7dox.

En plus de l'inhibition des complexes de manière séparée, l'effet d'une inhibition concomitante dans ces complexes a été étudié sur la sensibilité des cellules MCF-7.



Figure 37: Consommation d'oxygène mitochondriale dans les cellules MCF-7 après un prétraitement de 72h à l'aide d'inhibiteur du complexe I (roténone) et du complexe IV (KCN 20 μ M). Mesure de la consommation d'oxygène sur cellules perméabilisées des cellules MCF-7 prétraitées ou non avec une combinaison roténone (50 nM) et KCN (20 μ M) pendant 72h. Substrats respiratoires : Glutamate (5 mM) + Malate (5 mM) + Succinate (10 mM) + ADP (1,5 mM). N=10, moyenne \pm SEM, (Mann-Whitney).

Figure 38 : Effet de l'inhibition des complexes I et IV sur la sensibilité des cellules MCF-7 à la doxorubicine après un prétraitement de 72h par la roténone et le KCN. Les cellules MCF-7 sont traitées avec 200 nM de doxorubicine (DOX) en combinaison ou non avec de la roténone (50 nM) + KCN (20μ M). Les résultats sont exprimés en % de viabilité par rapport au témoin (control) approprié. N = 12, moyenne ± SEM, (Mann-Whitney).

Nos résultats montrent qu'un prétraitement pendant 72h des cellules MCF-7 à l'aide de roténone (inhibiteur du complexe I) et de KCN (inhibiteur du complexe IV) entraine une diminution significative de la consommation d'oxygène liée à la synthèse d'ATP dans ces cellules (-17%, p<0,05, **Figure 37**). De plus, cette double inhibition des complexes I et IV

entraine une augmentation significative de la résistance des cellules MCF-7 à la doxorubicine (+20%, p<0,05, **Figure 38**). Cette augmentation de la résistance des cellules MCF-7 est du même ordre que celle obtenue suite à l'inhibition du complexe I par la roténone (résultat article 1). Comme démontré précédemment, l'inhibition du complexe IV n'influe pas sur la viabilité de ces cellules. Par conséquent, ces résultats suggèrent que l'inhibition partielle du complexe I contribue à diminuer la sensibilité des cellules MCF-7 à la doxorubicine.

d. Discussion

Cette étude avait pour but de déterminer si la résistance des cellules cancéreuses mammaires à la doxorubicine était associée à des changements au sein du métabolisme énergétique mitochondrial et du métabolisme des cardiolipines. Nos résultats ont mis en évidence dans les cellules MCF-7dox, que (1) l'activité du complexe I était diminuée, (2) cette diminution de l'activité de complexe I était associée à un défaut d'assemblage de ce complexe probablement lié à une diminution de la quantité de CL, (3) cette diminution de l'activité du complexe I était associée à une diminution de la production d'ERO et de l'ouverture du mPTP sous doxorubicine et (4) la reproduction de cette diminution de l'activité du complexe I dans les cellules MCF-7 a entrainé une diminution de leur sensibilité à la doxorubicine.

Il a été observé que les cellules cancéreuses se caractérisent le plus souvent par une augmentation de la glycolyse aérobie pouvant être associée à une résistance aux traitements. Nous avons observé que la glycolyse aérobie est augmentée dans les cellules cancéreuses résistantes MCF-7dox. Il est peu probable que l'augmentation de la glycolyse observée dans les cellules MCF-7dox soit une adaptation énergétique pour compenser la diminution de l'activité du complexe I mitochondrial. En effet les résultats de cet article et ceux de l'article 2 suggèrent que les mitochondries des cellules MCF-7dox sont capables de synthétiser autant d'ATP que les mitochondries des cellules MCF-7 du fait d'un meilleur rendement de la conversion énergétique (rapport ATP/O). Ces résultats renforcent l'idée qu'une glycolyse augmentée n'est pas toujours la conséquence d'une altération du métabolisme énergétique mitochondrial (Zu et al., 2004).

Le complexe I de la chaine respiratoire mitochondriale permet l'oxydation du NADH, principale source d'équivalents réduits dans la mitochondrie, pour produire de l'ATP. En plus de sa fonction dans la phosphorylation oxydative, ce complexe est aussi une source importante d'ERO mitochondriale (Murphy, 2009) et joue un rôle dans la mort cellulaire via l'ouverture du mPTP (Bernardi, 2013). La présence d'un désassemblage de ce complexe est associée à une augmentation de la production d'ERO (Sharma et al., 2011), (He et al., 2013) et (Leman et al., 2015). Concernant l'ouverture du mPTP, une ouverture plus précoce de celui-ci a été observée lors de l'utilisation de substrats respiratoires spécifique du complexe I (Fontaine et al., 1998). A l'inverse, l'utilisation d'inhibiteur du complexe I (roténone, metformine) exerce un effet inhibiteur sur l'ouverture du mPTP induite par les ERO (Fontaine et al., 1998). En dehors de

son implication dans les fonctions mitochondriales, le complexe I participe à la réduction de la doxorubicine. La réduction de cette molécule entraine la formation d'un radical semiquinone puis la production d'ERO en réaction avec l'oxygène (Octavia et al., 2012). Récemment, l'inhibition de ce complexe par la sérine protéase (SERPINB3) dans des cellules cancéreuses d'hépatome a été associée à une augmentation de leur résistance à la doxorubicine (Ciscato et al., 2014). Dans cette étude, l'inhibition du complexe I s'accompagnait d'une moindre production d'ERO associée à une moindre ouverture du mPTP. Nos résultats sont accord avec ceux de cette étude. En effet nous montrons que (1) l'activité du complexe I est diminuée dans les cellules MCF-7dox, (2) la production de radical semiquinone de doxorubicine est réduite dans les cellules MCF-7dox, (3) la production de radical semiquinone après réduction de la doxorubicine est plus faible dans les cellules MCF-7 traitées avec de la roténone (inhibition du complexe I), (4) la doxorubicine inhibe l'ouverture du mPTP dans les cellules MCF-7dox, (5) la production d'ERO par des oxydants stimule l'ouverture du mPTP dans les cellules MCF-7dox et (6) la toxicité cellulaire de la doxorubicine est inhibée par l'utilisation d'un antioxydant mitochondrial dans les cellules MCF-7dox. Ces données suggèrent que la diminution de l'activité du complexe I dans les cellules MCF-7dox entraine une diminution de la formation du radical semiquinone et des ERO associées à la réduction de la doxorubicine. Ceci a pour conséquence de réduire la capacité d'ouverture de mPTP, ce qui peut contribuer à la résistance de ces cellules. Il est intéressant de noter que le mPTP est toujours fonctionnel et sensible aux ERO puisque l'utilisation du couple xanthine/xanthine oxydase conduit à une ouverture plus précoce du pore (en présence de calcium).

Le complexe I (ou NADH-ubiquinone oxydoréductase) est le plus gros complexe de la chaîne respiratoire mitochondrial. Il est composé d'environ 45 sous-unités pour un poids de 1MDa (Sharma et al., 2009). La structure particulière en forme de L de ce complexe est divisée en deux domaines : un domaine hydrophobe situé dans la membrane interne mitochondriale et un domaine hydrophile situé dans la matrice mitochondriale (Sharma et al., 2009). Le domaine hydrophobe contient le module P permettant le pompage des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire (Koopman et al., 2010). Le domaine hydrophile est composé par deux modules : le module Q permettant la réduction de l'ubiquinone et le module N permettant l'oxydation du NADH (Koopman et al., 2010) **Figure 39**.



Figure 39 : Structure du complexe I mitochondrial. Adapté d'après www.complexi.org/research.htlm

Nos résultats montrent que la diminution de l'activité du complexe I observée dans les cellules MCF-7dox est due à un désassemblage de ce complexe (accumulation du N module). Il a déjà été observé qu'un mauvais assemblage de ce complexe s'accompagnait d'une diminution de l'activité de celui-ci dans des fibroblastes (Leman et al., 2015).

Nos résultats montrent que le métabolisme des CL est altéré dans les cellules MCF-7dox. La synthèse des CL est majoritairement effectuée au niveau mitochondrial. Elle se déroule en deux étapes : une biosynthèse de novo aboutissant à la formation de la CL immatures (composition en acides gras non définitive) et un remodelage aboutissant à la formation de CL matures (composition en acides gras définitive) (Schlame et al., 2016). Nous observons une diminution de la quantité de CL (CL immatures + CL matures) associée à une augmentation de la quantité de MLCL (forme intermédiaire possédant trois chaines d'acides gras et non pas quatre) dans les mitochondries des cellules MCF-7dox. Ces résultats sont partiellement en contradiction avec ceux de Todor qui montrent une augmentation du contenu en CL dans des cellules cancéreuses mammaires résistantes à la doxorubicine et au cisplatine (Todor et al., 2012). Dans notre étude, nos résultats sont confortés par une diminution de l'activité enzymatique de la CLS (diminution de la forme immature des CL) et d'une diminution de l'expression protéique de la tafazzine (diminution du remodelage des CL) entrainant une accumulation de la forme MLCL. Les CL ont une fonction particulièrement importante dans la bioénergétique mitochondriale car elles interagissent avec les différents complexes respiratoires et participent à leur activité et à leur assemblage en supercomplexes. Les données observées sur le contenu des CL dans le cadre du cancer sont diverses. Ceci peut aller d'une diminution du contenu en CL dans les tumeurs cérébrales ou des cellules de rhabdomyosarcomes (Kiebish et al., 2008) et (Jahnke et al., 2010) à un contenu en CL inchangée dans les mitochondries issues d'un modèle *in vivo* de gliome (Kiebish et al., 2008).

De manière très intéressante nos résultats suggèrent que le désassemblage du complexe I est lié à la moindre quantité de CL. En effet le fait d'inhiber l'activité de la CLS par l'utilisation d'un siARN dans les cellules MCF-7 semble s'accompagner d'une anomalie de l'assemblage du complexe I (résultats préliminaires non montrés). Dans ces conditions, l'inhibition de la CLS diminue légèrement la consommation d'oxygène en présence de substrats du complexe I dans les cellules MCF-7. Néanmoins il n'est pas complètement exclu que la diminution de l'activité du complexe I soit aussi la conséquence d'une plus grande quantité de MLCL dans les mitochondries des MCF-7dox. Une accumulation de MLCL est associée au syndrome de Barth. Cette maladie est caractérisée par une augmentation du rapport MLCL/CL suite à une mutation du gène codant pour la tafazzine (enzyme du remodelage des CL - permet le passage de la forme MLCL à la forme CL matures). Dans ce contexte, cette accumulation de MLCL (diminution du contenu en CL matures) est associée avec une diminution des activités enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire suite à un assemblage diminué ainsi qu'à une déstabilisation de l'assemblage des complexes respiratoires mitochondriaux sous forme de supercomplexes (McKenzie et al., 2006) et (Gonzalvez et al., 2013). En revanche, il n'est pas encore clairement établi si les effets observés sur la mitochondrie sont dus à une diminution de la quantité de CL matures ou à une augmentation de la forme MLCL.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence un défaut au sein du métabolisme des CL dans les cellules MCF-7dox associé à une diminution de l'activité du complexe I. Dans ce contexte, la production d'ERO était diminuée et l'ouverture du mPTP retardée ce qui pourrait expliquer la résistance de ces cellules à la doxorubicine **Figure 40**.



Figure 40 : Schéma hypothétique expliquant le rôle du complexe I mitochondrial et du métabolisme des cardiolipines dans la résistance des cellules cancéreuses mammaires MCF-7dox à la doxorubicine.

B. Article 2 : Implication de l'ATP mitochondrial dans l'activité des pompes d'efflux retrouvées dans les mitochondries des cellules cancéreuses mammaires résistantes à la doxorubicine, MCF-7dox

a. Introduction

Version en révision à BBA General Subjects, numéro de manuscrit : BBAGEN-16-902

Le développement d'une résistance aux agents anticancéreux est un obstacle majeur au traitement des cancers par chimiothérapie. Cette résistance est souvent associée à l'apparition de pompes d'efflux ATP-dépendante (P-gp, MRP1 ou BCRP) exprimées au niveau de la membrane plasmique. Ces protéines appartiennent à la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et sont capables d'expulser les drogues du cytosol vers le milieu extracellulaire en utilisant l'ATP comme source d'énergie. Cet efflux permet une limitation de l'accumulation des drogues dans la cellule, et par conséquent une diminution de la cytotoxicité. Très peu d'études se sont intéressées à la localisation mitochondriale de ces transporteurs dans des cellules cancéreuses. Les transporteurs P-gp, BCRP et MRP1 ont été retrouvés au niveau mitochondrial dans différents types de cellules cancéreuses (exemples : P-gp : cellules leucémiques, hépatocarcinome, BCRP : hepatocarcinome, carcinome ovarien, pulmonaire et colorectal et MRP1 : neuroblastome, adenocarcinome mammaire, glioblastome). Bien que cela ne soit pas toujours le cas, il semble que globalement le sens de fonctionnement de ces pompes au sein des mitochondries soit le même qu'au niveau de la membrane plasmique : de l'intérieur vers l'extérieur. La mitochondrie intervenant dans différents processus cellulaires tels que la production d'énergie ou la mort cellulaire (apoptose intrinsèque, mitophagie), la présence de ces pompes au sein de ses membranes permettrait de la protéger contre les effets toxiques des agents chimiothérapeutiques utilisés et pourrait participer à la résistance des cellules. Actuellement, le seul moyen existant pour augmenter l'accumulation de la doxorubicine dans les mitochondries est d'utiliser des groupements « ciblant » cet organite.

Nous avions ainsi fait l'hypothèse que (1) des pompes d'efflux de drogues seraient présentes au sein des mitochondries des cellules cancéreuses mammaires résistantes à la doxorubicine (MCF-7dox), (2) que leur activité participerait à limiter l'accumulation de la doxorubicine dans cet organite et (3) que leur fonctionnement serait dépendant de la synthèse d'ATP mitochondriale.

ATP-dependent activity and mitochondrial localization of drug efflux pumps in doxorubicin-resistant breast cancer cells

Julie Dartier^{a, b}, Elsa Lemaitre^a, Igor Chourpa^{b, c, d}, Caroline Goupille^{a, e}, Stéphane

Servais ^{a, b, f}, Stéphan Chevalier ^{a, b, d}, Karine Mahéo ^{a, b, d, 1} and Jean-François Dumas

a, b, d, 1

^a INSERM UMR1069, "Nutrition, Croissance et Cancer", Tours, France

^b Université François Rabelais, Tours, France ^c

EA 6295 "Nanomédicaments et Nanosondes",

Tours, France ^d UFR Sciences Pharmaceutiques,

Tours, France ^e CHRU Bretonneau, Tours,

France ^f IUT, Tours, France

¹ These authors contributed equally to this work

Address for reprint requests and other correspondence:

Jean-François Dumas, INSERM UMR1069, Laboratoire de Nutrition, Croissance et

Cancer, Faculté de Médecine, Bâtiment Dutrochet, 10 boulevard Tonnellé, F-37032 TOURS, Cedex 1, France. tel: +33 247 36 60 59, fax: +33 247 36 62 26, e-mail: jeanfrancois.dumas@univ-tours.fr

Karine Mahéo, INSERM UMR1069, Laboratoire de Nutrition, Croissance et Cancer,

Faculté de Médecine, Bâtiment Dutrochet, 10 boulevard Tonnellé, F-37032 TOURS, Cedex 1, France. tel: +33 247 36 60 59, fax: +33 247 36 62 26, e-mail:

karine.maheo@univ-tours.fr

Abstract

Background. We hypothesized that, among the mechanisms of drug-resistance acquired by doxorubicin (DOX)-resistant breast cancer cells to maintain cell survival, ATP-dependent drug efflux pumps were expressed in their mitochondrial membranes and this, in turn, reduced accumulation of DOX in this subcellular compartment in relation to mitochondrial ATP production. Methods/Results. Mitochondrial DOX accumulation, the presence and the activity of mitochondrial efflux pumps and their relationship with mitochondrial ATP synthesis were analyzed in DOX-resistant (MCF7dox^R) and -sensitive (MCF-7^S) breast cancer cells. Mitochondrial accumulation of

DOX (by fluorescence) was decreased when ATP is produced, but only in MCF7dox^R. In these DOX-resistant cells, breast cancer resistance protein (BCRP) and multidrug resistance-associated protein (MRP1) were expressed and localized in mitochondria (confocal microscopy and confocal spectral imaging studies). In addition, mitochondrial accumulation of DOX was increased by BCRP and MRP1 inhibitors and, to a lower extent, by the mitochondrial ATP synthase inhibitor, oligomycin, in MCF-7dox^R. Conclusions. In conclusion, both BCRP and MRP1 were localized in mitochondria and participated to the reduction of mitochondrial accumulation of DOX in MCF-7dox^R. This process was partly dependent of mitochondrial ATP synthesis. General Significance. The present study provides novel insights in the involvement of mitochondria in the underlying mechanisms of DOX resistance in breast cancer cells.

Keywords: breast cancer, breast cancer resistance protein, chemoresistance, mitochondrial ATP synthesis, multidrug resistance-associated protein

Abbreviations

Bovine serum albumin: BSA; breast cancer resistance protein: BCRP; carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone: FCCP; confocal multispectral imaging: CSI; doxorubicin: DOX; laser scanning confocal microscopy: LCSM; multidrug resistance-associated protein: MRP; P-glycoprotein: Pgp; sulforhodamine B: SRB.
1. Introduction

The anthracycline doxorubicin (DOX) is one of the most widely used clinical anticancer agents but its full potential has not been reached because of both dosedependent cardiotoxicity in humans and occurrence of drug resistance by cancer cells and tumors [1].

One of the obstacles of chemotherapy efficacy is the overexpression of a superfamily of energy-dependent ATP binding cassette transporters, such as Pglycoprotein (Pgp), breast cancer resistance protein (BCRP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) that extrude anticancer drugs out of the cell [2], [3]. These pumps have been generally considered to be localized in the plasma membrane but some reports have suggested a more complex subcellular distribution [4], [5]. For instance, functionally active pumps have been reported to be localized in mitochondrial membranes of several type of cancer cells [6], [7]. Given the key role of mitochondria in cell death [8],[9], the mitochondrial localization of those pumps might probably participate to drug resistance. On the contrary, an increased accumulation of DOX in mitochondria might be a significant mechanism to counteract DOX resistance in cancer cells [10], [11]. Hence, expressions and functionality of active efflux pumps in DOX-resistant mammary cancer cells have to be precisely characterized.

Targeting cellular metabolism is becoming a promising strategy to overcome drug resistance in cancer therapy [10]. In particular, it has been suggested that reducing cellular energy metabolism (mitochondrial and/or glycolytic metabolism) could reduce drug resistance by decreasing the efflux of drugs outside the cells. Thus, it has been showed that oligomycin, an inhibitor of mitochondrial ATP synthase, could decrease Pgp activity located at the plasma membrane and increase DOX accumulation in DOX-resistant liver cancer cells [11]. In addition, lonidamine, an inhibitor of hexokinase, reduced intracellular ATP content and decreased energy supply for the ATP-driven efflux pump expressed at the plasma membrane level resistant in colon carcinoma cells [12]. Whether such a mechanism might also exist to mitochondrial efflux pumps remains to be elucidated.

In the present study, we hypothesized that, among the cellular mechanisms developed by DOXresistant breast cancer cells, they expressed ATP-dependent drug efflux pumps in mitochondrial membranes to reduce the accumulation of DOX in this subcellular compartment and, in turn, reduce its toxic effects. It is expected that mitochondrial ATP synthesis might be more efficient in order to optimize ATPdependent-efflux of DOX from mitochondria. Therefore, the aim of this study was to determine DOX accumulation, the presence and the functioning of efflux pumps and ATP synthesis efficiency in mitochondria from MCF-7dox^R, a DOX-resistant breast cancer cell line, in comparison to DOX-sensitive breast cancer cells (MCF-7^s).

2. Materials and methods

2.1. Drugs and chemicals

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich).

2.2 Cell culture

The human breast carcinoma cell line MCF-7^S was obtained from American Type Culture Collection (LGC Promochem, France). The DOX-resistant human breast cancer cell line MCF-7dox^R was a gift of Dr. K. Cowan (National Cancer Institute, Bethesda, MD). This DOX-resistant cell line was originally established by *in vitro* selection with increasing concentrations of DOX [13] and was grown in the presence of 1 μ M of DOX to maintain the multidrug-resistant phenotype. One week before experiments were performed, DOX was removed from the medium of MCF-7dox^R as described previously [13]. MCF-7^S and MCF-7dox^R were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM - Lonza) containing 5% fetal calf serum (Eurobio). All the cell lines were cultured at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂.

2.3. Preparation of isolated mitochondria

All steps were performed at 4°C to prevent degradation. Cells were detached and cell membrane was permeabilized by exposure to digitonin (6 μ g per 10⁶ cells for MCF-7^S and 8 μ g per 10⁶ cells for MCF-7dox^R). Then, cells were resuspended in isolation buffer (0.2 mM EDTA, 0.25 M Sucrose and 10 mM Tris-HCl, pH = 7.4) and then centrifuged at 800 x g for 10 min. The surnageant was recovered and the pellet was resuspended in isolation buffer and centrifuged at 1 000 x g for 10 min. The surnageant was centrifuged at 12 500 x g for 15 min. The mitochondrial pellet was resuspended in isolation buffer and protein concentration was determined using BCA kit (Bicinchoninic Acid Assay - Interchim) with bovine serum albumin (BSA) fatty acid free used as standard.

- 184 -

2.4. Mitochondrial DOX accumulation

Given that DOX exhibited self-fluorescence, the intensity of mitochondrial fluorescence was used to reflect the mitochondrial accumulation of DOX through fluorimeter. Isolated mitochondria (50 µg) was added in 1 mL of mitochondrial respiratory buffer (120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 3 mM HEPES, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ and 0.3% BSA fatty acid free, pH = 7.4) and energized with succinate (2.5 mM). Effects of energy (ADP and ATP 1.5 mM), oligomycin (0.15 µg), FCCP (carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone; 0.4 µM) or inhibitors of drug efflux pumps (5 µM Mitotane - BCRP inhibitor, 25 µM MK-571 – MRP1 inhibitor or 5 µM Verapamil - Pgp inhibitor) were tested. Then 5 µM of DOX was added in each samples and incubated at 25°C for 30 min. The samples were centrifuged at 12 500 x g for 3 min, the pellet was resuspended in 200 µL of mitochondrial respiratory buffer. This washing step was repeated one time and fluorescence was read to a microplate reader (ex/em: 485 nm/535 nm) (Mithras LB940 Multimode Microplate Reader, Berthold Technologies).

2.5. Immunofluorescence labelling and Laser Scanning Confocal Microscopy (LCSM)

MCF-7dox^R cells were seeded in Lab-Tek chamber 8-well slides at 21 000 cells per well for 24 hours. Mitochondria were stained with 0.6 μ M Mitotracker Deep Red (Molecular Probes) and nucleus was stained with Hoescht 33528 (1:10000) (Molecular Probes) for 1 h at 37°C - 5% CO₂. Then cells were washed with DPBS with Ca²⁺ and fixed with DPBS containing 4% formaldehyde during 15 min at room temperature (RT). The cells were washed with DPBS with Ca²⁺ containing 100 mM of glycine then permeabilized 3 x 5 min at RT, under agitation, with DPBS with Ca²⁺ containing 0.1% of triton. Cells were then incubated with saturation solution (DPBS with Ca²⁺ containing 3% BSA) during 30 min at RT under agitation. Anti-MRP1 mouse monoclonal antibody (ab24102, Abcam), anti-BCRP mouse monoclonal antibody (ab3379, Abcam) or anti-Pgp rabbit polyclonal (HPA002199, Sigma Prestiges Antibodies) were diluted in DPBS with Ca²⁺, 4% BSA at 1:50 (anti-BCRP), 1:100 (anti-MRP1) or 1:200 (anti-Pgp) and added on cells 1 hour at RT under agitation. Cells were incubated with secondary antibody coupled with green fluorescence dye Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) at 1:400 for 1 hour at RT. Samples were washed with DPBS and lamella were fixed with Fluorescent Mounting Medium (DAKO). Cells were observed on a confocal microscope (Olympus Fluoview FV500

Laser Scanning Confocal Microscope) and image acquisition was performed using Fluoview 500 v.5 software (Olympus).

2.6. Instrumental setup for confocal spectral imaging (CSI)

Fluorescence measurements were carried out using a LabRam confocal microspectrometer (Horiba-Jobin Yvon) equipped with a low dispersion grating (300 grooves per mm) and with an automated X-Y-Z scanning stage. A colour camera (WV-CP454E, Panasonic) together with a VITEC video card provided a digitalized TV image of a sample illuminated with a white light source. Green and red fluorescence was respectively excited with either a 491 nm line of an external, air-cooled, diode laser (Calypso, Optoprim) or a 632.8 nm line of a built-in, air-cooled, HeNe laser. Edge filters were used to reject the backscattered photons which have the same excitation wavelength as the excitation laser. The power on the samples was of about 150 μ W, the acquisition time was 0.02 s per spectrum. Sample irradiation and collection of fluorescence were performed through a 50× microscope objective (numerical aperture 0.75; Olympus). The confocal hole aperture was adjusted to 200 μ m to obtain ca. 0.8 - 1 μ m lateral and ca. 3.5 – 5.5 μ m axial resolution. The spectral resolution was 1 nm [14].

2.7. Performing CSI mapping on isolated mitochondria

Isolated mitochondria of MCF-7dox^R cells were stained by Mitotracker Deep Red (Molecular Probes) at 5 μ M during 1 hour at 37°C. Next 100 μ g of this mitochondria were platted / well in Lab-Tek chamber 4-well slides and keep adhere 1 hour and then fixed with DPBS containing 4% formaldehyde during 15 min at RT. Anti-MRP1 mouse monoclonal antibody (ab24102, Abcam), anti-BCRP mouse monoclonal antibody (ab3379, Abcam) or anti-Pgp rabbit polyclonal (HPA002199, Sigma Prestiges Antibodies) were diluted in DPBS with Ca²⁺, 4% BSA at 1:40 and added on cells over night at 4°C under agitation. Next, mitochondria were incubated with secondary antibody coupled with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) for BCRP, Alexa Fluor 532 (Molecular Probes) for Pgp, or Alexa 568 (Molecular Probes) for MRP1, at 1:400 for 1 hour at RT under agitation. Samples were washed with DPBS and lamella were fixed with ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes). Aggregates of the extracted mitochondria, selected for the apparently intact morphology, were scanned within X-Y plane with fixed step of 0.8 μ m that provided maps containing typically ca. 100 to 400 spectra (10×10 to 20×20 points). Complete fluorescence spectra (500-780 nm) were

recorded at each step. The fluorescence intensity maps were generated using the average intensity of the spectra within a range of 20 nm centered at the emission band maximum of each fluorophore: 520540 nm (BCRP pump), 550-570 nm (Pgp pump), 600-620 nm (MRP1 pump) and 660-680 nm (mitochondria). To simplify visualization all the resulting pump maps were presented in green pseudocolor. Those of the mitochondria were presented in red pseudocolor. Both acquisition and treatment of multispectral maps were performed with LabSpec software.

2.8. Mitochondrial oxygen consumption and ATP synthesis

Oxygen consumption and ATP synthesis rates were measured at 37°C on nonattached cells, previously permeabilized by exposure to digitonin (8 μ g per 10⁶ cells for MCF-7⁸ and 10 μ g per 10⁶ cells for MCF-7dox^R) and resuspended in the respiratory buffer (10 mM KH₂PO₄, 300 mM Mannitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA and 0.1% BSA fatty acid free, pH = 7.4 at 37°C). Plasma membrane were permeabilized in order to control the nature and the quantity of the substrates and therefore to determine the intrinsic functioning of oxidative phosphorylation system. Oxygen was measured polarographically with 3x10⁶ cells (Hansatech Instruments). ATP synthesis-related oxygen consumption was measured in the presence of NAD^+ (0.5 mM), Iodoacetate (glucose deshydrogenase inhibitor -2 mM), Glutamate and Malate (complex I substrates - 5 mM), Succinate (Complex II substrate - 5 mM) and ADP (1.5 mM). Oligomycin (ATP synthase inhibitor) was added (5.25 µg/mL) for the measurement of oxygen consumption not dedicated to ATP synthesis (energy wasting processes). Mitochondrial ATP synthesis was measured concomitantly to ATP synthesis-related oxygen consumption as previously described [15]. Briefly, 10 µl of cell suspension were sampled every 40 sec during 4 minutes, quenched with an equal volume of 10% perchloric acid and EDTA (25 mM) (to stop the reaction) and kept at -20°C. In order to quantify mitochondrial ATP synthesis, standard ATP solutions from 10⁻⁷ to 10⁻¹¹ M and samples were neutralized in a buffer (25 mM Hepes and 2 mM EDTA, pH = 7.75), diluted if necessary and quantified using Enliten ATP assay kit (Promega) and GloMax 20/20 luminometer (Promega).

2.9. FCCP treatment

To determine the effects of modulation of ATP synthesis efficiency on sensitivity to DOX in MCF-7dox^R, we artificially decreased efficiency of ATP synthesis in those cells by using FCCP (a protonophoric uncoupler). For analysis of efficiency of ATP synthesis, cells were plated out

at 8 000 cells per cm² in 25 cm² flasks. Twenty hours after plating, MCF-7^S or MCF-7dox^R were treated with FCCP (7.5 nM). All control conditions were treated with an equivalent volume of the solvent control (ethanol). The cells were treated for 48 hours prior to mitochondrial oxygen consumption or mitochondrial ATP synthesis measurement. For analysis of cell viability, cells were plated out at a density of 36 000 cells per well in 24-well plates. Twenty hours after plating, MCF-7dox^R were treated with DOX (10 μ M) and FCCP (7.5 nM) or combinations of those compounds for 72 hours prior to SRB assay (sulforhodamine B). All control conditions were treated with an equivalent volume of the solvent control (ethanol). The tested compounds were renewed every day. Basal effects of FCCP were normalized at 100% to represent only the potentiating effect of treatment. For analysis of intracellular ATP rate, cells were plated out at 20 000 cells per well in 96-well plates. Twenty hours after plating, MCF-7dox^R were treated normalized at 20 000 cells per well in 96-well plates.

2.10. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. Differences between groups were analyzed by Mann-Whitney test for non-paired observations or Wilcoxon signed-ranked test for two related samples. p<0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Mitochondrial accumulation of DOX is an ATP-dependent process and is increased by the inhibition of BCRP and MRP1 pumps in DOX-resistant breast cancer cells

We evaluated mitochondrial accumulation of DOX on isolated mitochondria from both cell lines MCF-7^S and MCF-7dox^R. Isolated mitochondria were incubated 30 min with DOX in the presence of energy (ADP/ATP), then washed and the content of accumulated DOX into mitochondria was estimated by measuring the fluorescence of DOX. Mitochondria from MCF-7dox^R significantly accumulated less DOX (-47%, p<0.01) than mitochondria from MCF-7^S (Figure 1A). We determined whether mitochondrial accumulation of DOX was dependent, or not, on the presence of energy (ADP/ATP) in isolated mitochondria of MCF-7^S and MCF-7dox^R incubated, or not, with ADP/ATP. In MCF-7^S cells, mitochondrial accumulation of DOX was unchanged in absence or presence of energy (ADP/ATP) (Figure 1B). On the contrary, in MCF-7dox^R, mitochondrial accumulation of DOX was decreased in presence of energy (ADP/ATP) (-20%, p<0.01; Figure 1C). Since mitochondrial accumulation of DOX was an energydependent process in MCF-7dox^R, we tested whether this was associated to the presence of functional ATP-dependent efflux pumps such as Pgp, BCRP or MRP1. As shown in figure 1D, in the presence of energy (ADP/ATP), inhibition of BCRP (by its inhibitor mitotane), or MRP1 (by its inhibitor MK-571) or both BCRP and MRP1 (by the combination of mitotane with MK571) increased mitochondrial accumulation of DOX in MCF-7dox^R (+9.5%, p<0.05 for mitotane, +13%, p<0.01 for MK-571 and +20%, p<0.05 for mitotane + MK571). In contrast, mitochondrial DOX accumulation was unchanged with verapamil, a Pgp inhibitor. In addition, in the absence of energy, mitotane and MK-571 had no effect on mitochondrial accumulation of DOX (data not shown).

3.2. BCRP and MRP1 pumps are expressed in mitochondria of DOX-resistant breast cancer cells

Since mitochondrial accumulation of DOX was increased by BCRP and MRP1 inhibitors in MCF-7dox^R, we tested then the presence of BCRP and MRP1 in mitochondria of those DOX-resistant cells. A potential co-localisation was studied by the two complementary fluorescence

microscopy techniques. We stained either the isolated mitochondria or the mitochondria on the whole cell with Mitotracker Deep Red and analyzed them by confocal multispectral imaging (CSI) or laser scanning confocal microscopy (LCSM), respectively. The fluorescence of mitochondria is shown in red pseudocolor and the fluorescence of pumps is shown in green pseudocolor. As illustrated with the typical CSI maps shown in figure 2A and 2B, both the MRP1 and BCRP pumps were co-localised with the isolated mitochondria. On the contrary, there was no co-localisation between Pgp and mitochondria (Figure 2C). The LSCM approach was extended to analyze the mitochondria in the whole cell. As shown in figure 3C, Pgp was not co-localised with Mitotracker Deep Red but was detected around Mitotracker Deep Red suggesting that Pgp was not expressed in mitochondria but only in plasma membrane in MCF-7dox^R. The two other studied efflux pumps, MRP1 (Figure 3A) and BCRP (Figure 3B) appeared localized in the cytoplasm resulting in a weak but significant overlapping of each pumps with Mitotracker Deep Red staining, suggesting that MRP1 and BCRP were partly expressed at the mitochondrial level. Taken together, these data showed the presence of the MRP1 and BCRP efflux pumps in mitochondria of MCF-7dox^R. On the contrary, expression of Pgp seemed restricted to plasma membrane of those cells.

3.3. Mitochondrial accumulation of DOX is linked to the mitochondrial ATP synthesis in DOX-resistant breast cancer cells

Since the mitochondrial efflux pumps require ATP for their activity in MCF-7dox^R, we tested the involvement of mitochondrial ATP synthesis in the mitochondrial accumulation of DOX in those DOX-resistant cells. The experiments were performed without energy (-ADP/ATP condition), or with both ADP (used for mitochondria to synthesize ATP) and ATP (to mimic energy supplied by glycolysis) (+ADP/ATP condition) or with only a source of energy for mitochondria (+ADP condition). When the only source of energy was the mitochondria (+ADP), accumulation of DOX was decreased in mitochondria of MCF-7dox^R in comparison to the condition without energy (-16%, p<0.005; Figure 4A). However, this reduction was lower than that observed with the combination of mitochondrial with non-mitochondrial source of energy (ADP/ATP condition) (-27% for +ADP/ATP in comparison to -ADP/ATP, p<0.005; Figure 4A). In the latter condition, oligomycin, a mitochondrial ATP synthase inhibitor, was able to increase mitochondrial accumulation of DOX in the presence of ADP/ATP (+14%, p<0.05) (Figure 4B). These data indicate that both mitochondrial and non-mitochondrial ATP participated to the energy-dependent accumulation of DOX in mitochondria of MCF-7dox^R.

3.4. ATP synthesis efficiency is higher in mitochondria of DOX-resistant breast cancer cells

Since mitochondrial ATP synthesis was involved in mitochondrial accumulation of DOX, we hypothesized that mitochondrial energy production in MCF-7dox^R cells might be adapted (probably more efficient) to partly satisfy the ATP demand necessary for the functioning of efflux pumps. We first analyzed efficiency of ATP synthesis in both DOX-sensitive and resistant cell lines. During oxidative phosphorylation, ATP synthesis is coupled to oxygen consumption by the mitochondrial respiratory chain. As shown in figure 5A, mitochondrial oxygen consumption associated to ATP synthesis was lower (-30%, p<0.005) in MCF-7dox^R than MCF-7^S. There was no difference in mitochondrial ATP synthesis between cells (Figure 5B). As a consequence, the efficiency of ATP synthesis (ATP/O ratio) was higher in mitochondria from MCF-7dox^R than mitochondria from MCF-7^S (+40%, p<0.05; Figure 5C), indicating a lower energy wasting in MCF-7dox^R. Collectively, our data showed that energy wasting processes were lower in mitochondria from MCF-7dox^R in agreement with an optimized mitochondrial ATP synthesis.

3.5. Reduction of ATP synthesis efficiency by FCCP treatment had no effect on mitochondrial accumulation of DOX nor on sensitivity to the drug in DOXresistant breast cancer cells

A decrease in mitochondrial ATP synthesis by lowering efficiency of ATP synthesis could be a cellular mechanism for increasing both the mitochondrial accumulation of DOX in resistant cells and the anticancer effects of the drug. We artificially decreased efficiency of ATP synthesis by treating MCF-7dox^R cells with the protonophoric uncoupler FCCP for 48 hours. As shown in Figure 6A, mitochondrial efficiency of ATP synthesis was significantly decreased by FCCP (-39%; p<0.05). However, cellular viability was not modified by the same treatment with FCCP in MCF-7dox^R, suggesting that sensitivity to DOX was not affected by the decrease in mitochondrial efficiency of ATP synthesis in those DOX-resistant cells (Figure 6B). In fact, FCCP treatment had no effect on total cellular ATP content in MCF-7dox^R cells suggesting that ATP production from glycolysis was increased to maintain cellular ATP level (Figure 6C). A possibility would be that, in the presence of both mitochondrial and non-mitochondrial source of energy (+ADP/ATP), mitochondrial efflux pumps were always sufficiently fueled to work. Indeed, mitochondrial accumulation of DOX was unchanged by FCCP (Figure 6D). These data

suggested that regulation of efficiency of mitochondrial ATP synthesis is necessary but not sufficient to decrease the activity of efflux pumps and to increase the resulting mitochondrial accumulation of DOX and anticancer effects. This is probably due to the fact that the lower production of mitochondrial ATP was compensated by higher ATP from glycolysis.

4. Discussion

The present study shows that in doxorubicin (DOX)-resistant breast cancer cells (MCF-7dox^R) (1) mitochondrial accumulation of the drug is decreased by the presence of ATP, (2) mitochondrial accumulation of the drug is increased when BCRP and MRP1, two ATP-dependent efflux pumps we showed expressed in mitochondria, were inhibited and (3) mitochondrial accumulation of the drug is increased by inhibition of mitochondrial ATP synthesis.

Pgp, MRP and BCRP are considered as the three major transporters causing drug resistance. They perform ATP hydrolysis-dependent efflux transport of a large number of structurally and chemically unrelated compounds that include anticancer drugs such as DOX, methotrexate, vincristine, and etoposide [16], [17] and [18]. In spite of the similarity in the resistance profiles of these pumps, MRP1 substrates include also glutathione, glucuronate and sulfate conjugates. BCRP expression in cancer cells confers drug- resistance in leukemia and higher levels are reported in solid tumors from the digestive tract, endometrium, lung and melanoma [19]. Its expression is generally low in breast cancer tumors [20]. MRP is overexpressed in aggressive breast carcinoma subtypes [21]. There is significant association between BCRP and MRP expression and tumor response to chemotherapy and progressionfree survival [21] and [22]. Although Pgp, BCRP and MRP1 transporters are mainly localized in the plasma membrane, they are also been described to be expressed in subcellular compartments [4] and [23]. In particular, BCRP and MRP1 have been found to be expressed in mitochondria from several type of cancer cells [7] and [24]. The localization of Pgp in mitochondrial membranes is controverted and was brought into question by Patherson and al. [25]. BCRP and MRP maintained the direction of drug transport similarly to that in the plasma membrane (inside towards outside) [24] and [7]. Therefore, these pumps could be involved in the protection of mitochondria from damage due to anticancer drugs and, in turn, they could participated to drug resistance.

To our knowledge, the potential localization and functionality of MRP and BCRP in mitochondria on mammary resistant cancer cells was unknown. For this study performed on DOX-resistant breast cancer cells, the localization of efflux pumps was studied by two complementary fluorescence microscopy techniques using isolated mitochondria and whole cell. In addition, a functional study by measuring DOX accumulation in mitochondria in presence of inhibitor were performed. Firstly, we found that the two efflux pumps: MRP1 and BCRP were present in mitochondrial membranes of MCF-7dox^R. Secondly, our data showed that mitochondrial accumulation of DOX was decreased by energy only in MCF-7dox^R. Thirdly, we found that specific inhibition of MRP1 and BCRP, by the use of MK-571, a MRP1 inhibitor and mitotane, a BCRP inhibitor, induced an increase in DOX accumulation in mitochondria from MCF-7dox^R in the presence of energy. Pgp was probably not involved in this DOX resistance mechanism since verapamil, a Pgp inhibitor, had no effect on mitochondrial DOX accumulation in MCF-7dox^R. In addition, we did not found Pgp in mitochondria of MCF-7dox^R by using two complementary imaging techniques. This is in agreement with previous data showing that Pgp was not expressed in mitochondria of MCF-7dox^R cell lines [25]. All together, our data show that functional MRP1 and BCRP pumps were expressed in the mitochondrial membrane of DOX-resistant breast cancer cells to pump out DOX from mitochondria. It is worth mentioning that drug accumulation in cell mitochondria has been showed to reduce drug resistance. For instance, when the mitochondrial DOX accumulation was selectively increased, by the use of a mitochondriotropic ligandlinked DOX, the in vitro sensitivity of resistant breast or prostate cells to this drug was enhanced [26] and [27]. To our knowledge, our data are the first to report that mitochondrial accumulation of DOX, in DOX-resistant breast cancer cells, is negatively linked to mitochondrial ATP production. Indeed, we found that full inhibition of mitochondrial ATP synthesis, by oligomycin, resulted in higher accumulation of DOX in mitochondria of MCF-7dox^R. On the contrary, stimulation of mitochondrial ATP synthesis by ADP decreased mitochondrial accumulation of DOX in MCF-7dox^R. In the present study, we found that mitochondria of DOX-resistant breast cancer cells are able to synthetize ATP more efficiently at the difference of DOX-sensitive breast cancer cells. However, treatment of MCF-7dox^R by the mitochondrial uncoupler FCCP was associated neither to a higher mitochondrial accumulation of DOX, nor a higher sensitivity of the cells to DOX. On the contrary efficiency of mitochondrial ATP synthesis is substantially decreased by FCCP treatment to a value very similar to that obtained in MCF-7^s. Our data therefore suggest that modulation of mitochondrial ATP production is necessary but not sufficient to decrease activity of mitochondrial efflux pumps and to increase mitochondrial accumulation of DOX. In consequence, this is not sufficient to counteract DOX-resistance in MCF-7dox^R. This is probably due to the fact that MCF7dox^R could exploit the advantages of both glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation to maintain cellular ATP content. Therefore, we found that the content of ATP intracellular was not modified by FCCP suggesting that glycolysis was able to compensate a lower production of ATP by mitochondria.

In conclusion, in DOX-resistant breast cancer cells, we have found that mitochondrial accumulation of DOX is dependent on (1) the presence of functionally active MRP1 and BCRP pumps in the mitochondrial membrane and (2) the presence of ATP from both glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation. It is expected that mitochondrial BCRP and MRP1 were involved in efflux of DOX to protect mitochondria from damage and prevent induction of mitochondria-dependent cell death and therefore participate to acquired DOX-resistance in MCF-7dox^R. Although other mechanisms of drug resistance have been described, mitochondrial BCRP and MRP1 may represent interesting novels therapeutic targets.

Acknowledgements

Authors thanks Julien Burlaud- Gaillard from "Plateforme R.I.O. de Microscopie Electronique de l'Université François-Rabelais de Tours" for his precious technical support. Julie Dartier received a fellowship from "Région Centre-Val-de-Loire". This project was supported by grants from "Région Centre-Val-de-Loire" ("APR IR Mitochimio" and LIPIDS project of ARD2020-Biomedicaments) and "Ligue Nationale contre le Cancer (CD37 et CD85)", France.

References

- [1] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, Pharmacol. Rev., 56 (2004) 185–229.
- [2] M.M. Gottesman, T. Fojo, S.E. Bates, Multidrug Resistance in Cancer: Role of Atp-Dependent Transporters, Nat. Rev. Cancer, 2 (2002) 48–58.
- [3] H. Glavinas, P. Krajcsi, J. Cserepes, B. Sarkadi, The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox), Drug Discov. Today, 13 (2008) 379–393.
- [4] A.M. Kaufmann, A.J. Toro-Ramos, J.P. Krise, Assessment of Golgi Apparatur versus Plasma Membrane-Localized Multi-Drug Resistance-Associated Protein 1, Mol. Pharm., 5 (2008) 787–794.
- [5] N.M. Maraldi, N. Zini, S. Santi, K. Scotlandi, S. Bologna, M. Elettronica, Pglycqwotein subcefHu # ar locatiz on and cell m in Marl gene-transfected human osteosarcoma cetts, Biol. Cell, 91 (1999) 17–28.
- [6] E. Munteanu, M. Verdier, F. Grandjean-Forestier, C. Stenger, C. JayatVignoles, S. Huet, J. Robert, M.H. Ratinaud, Mitochondrial localization and activity of Pglycoprotein in doxorubicin-resistant K562 cells, Biochem. Pharmacol., 71 (2006) 1162–1174.
- [7] E.A. Roundhill, S.A. Burchill, Detection and characterisation of multi-drug resistance protein 1 (MRP-1) in human mitochondria, Br. J. Cancer, 106 (2012) 1224–33.
- [8] X. Wang, The expanding role of mitochondria in apoptosis, Gene Dev, 15 (2001) 2922–33.
- [9] K.F. Ferri, G. Kroemer, Organelle-specific initiation of cell death pathways, Nat. Cell Biol., 3 (2001) E255–E263.
- [10] P. V Maximchik, a V Kulikov, B.D. Zhivotovsky, V.G. Gogvadze, Cellular Energetics as a Target for Tumor Cell Elimination, Biochemistry (Moscow), 81 (2016) 65–79.
- [11] Y.C. Li, K.P. Fung, T.T. Kwok, C.Y. Lee, Y.K. Suen, S.K. Kong, Mitochondriatargeting drug oligomycin blocked P-glycoprotein activity and

triggered apoptosis in doxorubicin-resistant HepG2 cells, Chemotherapy, 50 (2004) 55–62.

- [12] M. Fanciulli, T. Bruno, A. Giovannelli, F.P. Gentile, M. Di Padova, O. Rubiu, A. Floridi, Energy metabolism of human LoVo colon carcinoma cells: Correlation to drug resistance and influence of lonidamine, Clin. Cancer Res., 6 (2000) 1590–1597.
- [13] C.R. Fairchild, S.P. Ivy, J. Whang-peng, N. Rosen, M.A. Israel, P.W. Melera, K.H. Cowan, M.E. Goldsmith, resistant Human Breast Cancer Cells, 8 (1987) 5141–5148.
- [14] S. Vibet, K. Mahéo, J. Goré, P. Dubois, P. Bougnoux, I. Chourpa, Differential subcellular distribution of mitoxantrone in relation to chemosensitization in two human breast cancer cell lines, Drug Metab. Dispos., 35 (2007) 822–828.
- [15] L. Peyta, K. Jarnouen, M. Pinault, C. Guimaraes, J.P. Pais De Barros, S. Chevalier, J.F. Dumas, F. Maillot, G.M. Hatch, P. Loyer, S. Servais, Reduced cardiolipin content decreases respiratory chain capacities and increases ATP synthesis yield in the human HepaRG cells, Biochim. Biophys. Acta Bioenerg., 1857 (2016) 443–453.
- [16] K. Natarajan, Y. Xie, M.R. Baer, D.D. Ross, Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance, Biochem. Pharmacol., 83 (2012) 1084–1103.
- [17] Y.-K. Zhang, Y.-J. Wang, P. Gupta, Z.-S. Chen, Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Cancer Therapy, (n.d.).
- [18] F.J. Sharom, The P-glycoprotein multidrug transporter, Essays Biochem, 50 (2011) 161–178.
- [19] J.E. Diestra, G.L. Scheffer, I. Català, M. Maliepaard, J.H.M. Schellens, R.J. Scheper, J.R. Germà-Lluch, M.A. Izquierdo, Frequent expression of the multidrug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material, J. Pathol., 198 (2002) 213–219.
- [20] R.W. Robey, O. Polgar, J. Deeken, K.W. To, S.E. Bates, ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance, Cancer Metastasis Rev., 26 (2007) 39– 57.

- [21] A. Yamada, T. Ishikawa, I. Ota, M. Kimura, D. Shimizu, M. Tanabe, T. Chishima, T. Sasaki, Y. Ichikawa, S. Morita, K. Yoshiura, K. Takabe, I. Endo, High expression of ATP-binding cassette transporter ABCC11 in breast tumors is associated with aggressive subtypes and low disease-free survival, Breast Cancer Res Treat., 3 (2013) 773-782.
- [22] Y.H. Kim, G. Ishii, K. Goto, S. Ota, K. Kubota, Y. Murata, M. Mishima, N. Saijo, Y. Nishiwaki, A. Ochiai, Expression of breast cancer resistance protein is associated with a poor clinical outcome in patients with small-cell lung cancer, Lung Cancer, 65 (2009) 105–111.
- [23] A. Rajagopal, SM. Simon, Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins, Mol Biol Cell., 14 (2003) 3389-3399
- [24] M. Solazzo, O. Fantappiè, M. D'Amico, C. Sassoli, A. Tani, G. Cipriani, C. Bogani, L. Formigli, R. Mazzanti, Mitochondrial expression and functional activity of breast cancer resistance protein in different multiple drug-resistant cell lines, Cancer Res., 69 (2009) 7235–7242.
- [25] J.K. Paterson, M.M. Gottesman, P-Glycoprotein is not present in mitochondrial membranes, (2007).
- [26] T.A. Theodossiou, Z. Sideratou, M.E. Katsarou, D. Tsiourvas, Mitochondrial delivery of doxorubicin by triphenylphosphonium- functionalized hyperbranched nanocarriers results in rapid and severe cytotoxicity, Pharm. Res., 30 (2013) 2832–2842.
- [27] M.R. Vakili, H.S. Abyaneh, O. Molavi, R. Lai, A. Lavasanifar, Mitochondrial delivery of doxorubicin via triphenylphosphine modification for overcoming drug resistance in MDA-MB-435 / DOX cells Mitochondrial delivery of doxorubicin via triphenylphosphine modification for overcoming drug resistance in MDA-MB-435 / DOX, (2014).

Titles and legends to figures

Figure 1: Mitochondrial accumulation of DOX is an energy-dependent process and is increased by the inhibition of BCRP and MRP1 pumps in DOX-resistant breast cancer cells. Measurements were performed on isolated mitochondria from MCF-7^S and MCF-7dox^R incubated in the presence of DOX during 30 min and intramitochondrial DOX fluorescence (a.u.) was measured. (A) Mitochondrial DOX accumulation in the presence of energy (+ADP/ATP) in MCF-7^S and MCF-7dox^R (n=5). Mitochondrial DOX accumulation in the presence of energy (+ADP/ATP) or not (-ADP/ATP) in (B) MCF-7^S (n=3) and (C) MCF-7dox^R (n=9). (D) With energy (+ADP/ATP) and with Mitotane (BCRP inhibitor) (n=18), MK-571 (MRP1 inhibitor) (n=16), Verapamil (Pgp inhibitor) (n=3) or Mitotane + MK-571 (n=8). The data are presented as mean \pm SEM. * p<0.05, ** p<0.01.

Figure 2: Detection of mitochondrial efflux pumps by confocal spectral imaging in DOX-resistant breast cancer cells. Measurements were performed on isolated mitochondria from MCF-7dox^R. The fluorescence of mitochondria is shown in red pseudocolor (mito map). The fluorescence of pumps (MRP1, BCRP or Pgp) is shown in green pseudocolor (pump map). Fluorescence ICS data on co-localisation of green and red fluorescence maps over the mitochondria (white light images shown in the left column) for (A) MRP1, **(B)** BCRP and **(C)** Pgp. Images are representative of each mitochondria population analyzed.

Figure 3: Detection of efflux pumps by confocal laser scanning microscopy in DOX-resistant breast cancer cells. Measurements were performed at the whole cell level in MCF-7dox^R. Cells have been labelled with Mitotracker Deep Red (red; mito) and Hoescht (blue; nucleus), fixed and incubated with anti-MRP1 or anti-BCRP or anti-Pgp primary antibodies and then with secondary antibodies coupled with Alexa Fluor 488 (green; pump). Co-localisation of the mitochondrial-specific Mitotracker Deep Red dye and **(A)**, MRP1 **(B)** BCRP or **(C)** Pgp. Images are representative of each cell population analyzed.

Figure 4: Mitochondrial accumulation of DOX is linked to the mitochondrial ATP synthesis in DOX-resistant breast cancer cells. Measurements were performed on

isolated mitochondria from MCF-7dox^R incubated in the presence of DOX during 30 min and intra-mitochondrial DOX fluorescence (a.u.) was measured. **(A)** Mitochondrial DOX accumulation in the presence of ADP/ATP, ADP or without energy (-ADP/ATP) (n=19). **(B)** Mitochondrial DOX accumulation in the presence of energy (+ADP/ATP) and with (+oligo) or without (-oligo) oligomycin, a mitochondrial ATP synthase inhibitor (n=7). The data are presented as mean \pm SEM. * p<0.05, *** p<0.005.

Figure 5: ATP synthesis efficiency is higher in mitochondria from DOXresistant breast cancer cells. Mitochondrial bioenergetics measurements were performed on permeabilized cells obtained from MCF-7^S and MCF-7dox^R. (A) Mitochondrial oxygen consumption related to ATP synthesis (n=12). (B) Mitochondrial ATP synthesis (n=12). (C) Efficiency of mitochondrial ATP synthesis determined as mitochondrial ATP production / mitochondrial oxygen consumption ratio (n=12). The data are presented as mean \pm SEM. * p<0.05; *** p<0.005.

Figure 6: Reduction of ATP synthesis efficiency by FCCP treatment had no effect on mitochondrial accumulation of DOX nor on sensitivity to the drug in DOXresistant breast cancer cells. (A) Efficiency of mitochondrial ATP synthesis determined as mitochondrial ATP production / mitochondrial oxygen consumption ratio in MCF-7dox^R treated (FCCP) or not (control) by FCCP for 48 hours (n=6). Measurement were performed on permeabilized cells. (B) Cellular viability of MCF7dox^R. Cells were not treated (control) or treated by DOX or FCCP for 72 hours (n=3). (C) Intracellular ATP content in MCF-7dox^R treated (FCCP) or not (control) by FCCP for 24 hours (n=3). (D) Mitochondrial DOX accumulation in absence of energy (-ADP/ATP) or in the presence of energy (+ADP/ATP) without (-FCCP) or with (+FCCP) FCCP (n=4 for -ADP/ATP and n=5 for +ADP/ATP conditions). Measurements were performed on isolated mitochondria from MCF-7dox^R incubated in the presence of DOX, with or without ADP/ATP or FCCP during 30 min. The data are presented as mean \pm SEM. * p<0.05, ** p<0.01.





Figure 1

- 201 -

A - Mitochondria/MRP1



WLimage

Pump image

Mito image

Merge

B - Mitochondria/BCRP



C - Mitochondria/Pgp



Figure 2

A - Mitochondria/MRP1



B - Mitochondria/BCRP



C - Mitochondria/Pgp



Figure 3

+ MRP1

+ BCRP





Figure 4

В





Figure 5





Figure 6

c. Discussion

L'objectif de cette étude était de déterminer la présence et la fonctionnalité de pompes d'efflux des agents anticancéreux au sein des mitochondries des cellules MCF-7dox et le rôle de la synthèse d'ATP mitochondriale dans leur fonctionnement.

Nos résultats mettent en évidence, dans les mitochondries des cellules MCF-7dox : (1) la présence de deux transporteurs d'efflux des drogues (BCRP et MRP1), (2) une accumulation de doxorubicine diminuée en présence d'énergie totale (ATP cytosolique et ATP mitochondrial), (3) une augmentation de l'accumulation intramitochondriale de la doxorubicine quand les transporteurs BCRP et MRP1 sont inhibés ou (4) quand la synthèse d'ATP mitochondriale.

Cette étude est la première à démontrer la présence simultanée de deux pompes d'efflux dans les mitochondries de cellules cancéreuses mammaires résistantes à la doxorubicine ainsi que la participation de l'ATP mitochondrial dans le fonctionnement de ces pompes.

Comme il est très difficile d'obtenir des préparations de mitochondries isolées totalement pures et sans contamination des autres composants de la cellule, nous avions exclu de déterminer la présence des pompes au sein des mitochondries par western blotting. Nous avons ainsi réalisé des expériences de microscopie sur mitochondries isolées (microscopie confocale multispectrale) et sur cellules entières (microscopie confocale). Ceci nous a permis de démontrer la présence de deux transporteurs (BCRP et MRP1) au niveau des mitochondries des cellules MCF-7dox. Deux études ont rapporté la présence de ces deux pompes dans des mitochondries de divers types de cellules cancéreuses (Solazzo et al., 2009) et (Roundhill et al., 2012). Dans ces deux études, l'activité de la pompe d'efflux mitochondriale identifiée permettait de limiter la quantité intramitochondriale d'agent thérapeutique et participerait donc à la résistance de ces cellules en protégeant la mitochondrie contre les effets toxiques de ces molécules. A notre connaissance, nos résultats sont les premiers à montrer la présence simultanée de ces deux transporteurs dans les mitochondries des cellules cancéreuses mammaires résistantes à la doxorubicine. De plus, nos résultats confirment que le fonctionnement des transporteurs retrouvés est identique à celui des pompes présentes au sein de la membrane plasmique : efflux de la drogue de l'intérieur vers l'extérieur et dépendant de la présence d'énergie. En effet dans les cellules MCF-7dox, (1) la quantité intramitochondriale de doxorubicine est diminuée en présence d'énergie et (2) cette quantité est augmentée en présence d'inhibiteurs des pompes d'efflux (MK-571 et mitotane - inhibiteurs spécifiques). Il est donc probable que la présence des transporteurs BCRP et MRP1 au sein des mitochondries de ces cellules participent à leur résistance en diminuant l'accumulation de la doxorubicine et par conséquent en limitant les effets toxique de cette molécule. De manière intéressante, l'inhibition combinée de ces deux transporteurs entraine une augmentation de l'accumulation de manière additive indiquant que ces deux pompes d'efflux fonctionnent de façon indépendante et seraient toutes les deux impliquées dans la protection de la mitochondrie. Dans notre modèle, la double présence de ces transporteurs pourrait permettre l'efflux d'une plus grande variété de molécules. En revanche, dans les cellules MCF-7dox, le transporteur P-gp est uniquement localisé au niveau de la membrane plasmique. En effet, les expériences de microscopie ne mettent pas en évidence la présence de la P-gp dans les mitochondries. De plus, le vérapamil, un inhibiteur de cette pompe, n'influence pas l'accumulation intramitochondriale de la doxorubicine. Nos résultats sont en accord avec une précédente étude rapportant une localisation de la P-gp uniquement au niveau plasmique dans les cellules MCF-7dox (Paterson et al., 2007).

L'activité d'efflux de ces pompes étant un mécanisme dépendant de l'ATP, nous avions émis l'hypothèse que la synthèse d'ATP mitochondriale pourrait participer à l'activité de ces pompes. Nos résultats montrent pour la première fois que l'activité des transporteurs BCRP et MRP1 présents dans les mitochondries des cellules MCF-7dox dépend partiellement de la synthèse d'ATP mitochondriale. En effet (1) en présence d'énergie, l'accumulation mitochondriale de doxorubicine est augmentée quand la synthèse d'ATP mitochondriale est inhibée par l'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase) et (2) l'ajout d'ADP (utiliser pour la synthèse d'ATP mitochondriale) est suffisant pour diminuer l'accumulation mitochondriale de doxorubicine. Il a déjà été montré que la diminution du métabolisme énergétique (glycolyse ou phosphorylation oxydative) peut réduire le fonctionnement des pompes d'efflux situées dans la membrane plasmique après avoir entrainé une diminution du contenu intracellulaire en ATP. Ainsi, l'utilisation de lonadimine (inhibiteur de la glycolyse) entraine une diminution de l'ATP intracellulaire disponible pour le fonctionnement du transporteur P-gp (niveau plasmique) dans des modèles de cellules cancéreuses colorectales résistantes à la doxorubicine (Fanciulli et al., 2000). Cette diminution de l'ATP intracellulaire augmente la sensibilité de ces cellules à la doxorubicine. D'autre part, l'utilisation d'oligomycine dans un modèle de cellules hépatiques cancéreuses résistantes entraine une augmentation de l'accumulation intracellulaire de la doxorubicine (Li et al., 2004). Néanmoins, nos résultats montrent que l'ATP mitochondrial

seul, n'est pas suffisant pour permettre une activité maximale des pompes d'efflux présentes dans les mitochondries des cellules MCF-7dox.

Cet effet ne semble pas être la conséquence d'un mauvais fonctionnement de la phosphorylation oxydative mitochondriale dans les cellules MCF-7dox. En effet, nos résultats montrent au contraire que la capacité des mitochondries des cellules MCF-7dox à produire de l'ATP est meilleure que celle des cellules MCF-7 (rapport ATP/O augmenté) et est même identique à celle généralement rapportée pour des cellules non cancéreuses (Cocco et al. 2009). Ce résultat indique que les mitochondries des cellules MCF-7dox peuvent synthétiser une même quantité d'ATP pour une plus faible consommation d'oxygène en comparaison des mitochondries des cellules sensibles. Ceci suggère que les cellules MCF-7dox ont adapté leur métabolisme énergétique mitochondrial dans le but d'alimenter plus facilement en ATP les transporteurs BCRP et MRP1 présents dans leurs mitochondries. Cependant nos résultats ne montrent pas que cette adaptation du métabolisme énergétique mitochondrial puisse participer à la résistance des cellules MCF-7dox à la doxorubicine. En effet, l'utilisation d'une molécule découplante (FCCP) dans les cellules MCF-7dox (1) diminue l'efficacité de la synthèse d'ATP mitochondriale (rapport ATP/O), (2) ne modifie pas l'accumulation mitochondriale de la doxorubicine et (3) ne modifie pas la sensibilité de ces cellules à la doxorubicine. Il est toutefois important de noter que le FCCP ne modifie pas non plus le contenu intracellulaire en ATP suggérant que l'ATP fournie par la glycolyse compense la diminution de la synthèse d'ATP mitochondriale observée. Il semble donc que la synthèse d'ATP mitochondriale ne soit pas une cible suffisante pour inhiber totalement l'activité mitochondriale des transporteurs BCRP et MRP1 et donc pour diminuer la résistance des cellules MCF-7dox à la doxorubicine.

En conclusion, cette étude démontre pour la première fois, la présence de deux pompes d'efflux ATP-dépendante (BCRP et MRP1) dans les mitochondries des cellules cancéreuses mammaires résistantes à la doxorubicine, MCF-7dox. Ces pompes permettent une diminution de l'accumulation mitochondriale de la doxorubicine, montrant que le sens de transport de ces pompes est le même qu'au niveau plasmique (de l'intérieur vers l'extérieur). Cette étude démontre aussi que la synthèse d'ATP mitochondriale participe partiellement au fonctionnement de deux transporteurs. Nos résultats suggèrent que les transporteurs BCRP et MRP1 au sein des mitochondries des cellules MCF-7dox participent à la résistance de ces cellules à la doxorubicine.

C. Résultats complémentaires : Implication du métabolisme mitochondrial dans l'effet chimiosensibilisant du DHA sur les cellules cancéreuses mammaires

a. Introduction

Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que le DHA augmente l'effet toxique des anthracyclines et que cet effet chimiosensibilisant implique un stress oxydant. Une supplémentation en DHA entraine une augmentation de son incorporation dans les phospholipides y compris dans les cardiolipines (CL). L'incorporation du DHA au niveau des CL s'accompagne d'un stress oxydant mitochondrial et d'une peroxydation des CL entrainant une augmentation de la toxicité. Le métabolisme énergétique peut aussi être modifié suite à l'incorporation du DHA dans les CL. La supplémentation en DHA en combinaison avec des agents thérapeutiques entraine une diminution de l'expression protéique de plusieurs des complexes respiratoires mitochondriaux (I, II et ATP synthase) et entraine une diminution de la viabilité cellulaire dans des cellules cancéreuses gastriques.

Dans cette étude, nous avions donc émis l'hypothèse que l'effet sensibilisant du DHA à la doxorubicine pouvait être lié au métabolisme mitochondrial. Ainsi, le DHA en s'incorporant dans les CL serait susceptible (1) de rendre ces phospholipides plus sensibles à la peroxydation lipidique induite par la doxorubicine, (2) d'entrainer une altération du fonctionnement énergétique mitochondrial et (3) de stimuler l'apoptose mitochondriale.

b. Résultats

La supplémentation en DHA induit un effet chimiosensibilisant spécifiquement dans les cellules MCF-7dox.

En condition basale, la viabilité des cellules MCF-7dox est d'environ 300 fois supérieure à celle des cellules MCF-7 après un traitement de 7 jours par de la doxorubicine (IC50 cellules MCF-7dox = 10μ M et IC50 cellules MCF-7 = 35 nM).

La supplémentation en DHA n'induit pas d'effet toxique sur les cellules MCF-7 et MCF-7dox après un traitement de 7 jours.

La supplémentation en DHA pendant 7 jours, sur les cellules cancéreuses mammaires résistantes à la doxorubicine, MCF-7dox conduit à une augmentation significative de la cytotoxicité de cette molécule d'environ 20% (p<0,01, **Figure 41**). La doxorubicine (10 μ M) entraine une diminution de la viabilité de 45 % dans les cellules témoins et de 62% dans les cellules supplémentées par le DHA (30 μ M). En revanche, dans les cellules MCF-7, la supplémentation en DHA n'augmente pas la sensibilité des cellules à la doxorubicine.





Test de chimiosensibilisation réalisé sur 7 jours. Les cellules MCF-7 ont été traitées avec 35 nM de doxorubicine et les cellules MCF-7dox ont été traitées avec 10 μ M de doxorubicine. Ces deux lignées cellulaires sont co-traitées ou non avec 30 μ M de DHA. Les résultats sont exprimés en % de viabilité par rapport au témoin approprié. N = 5 pour les cellules MCF-7 et N = 14 pour les cellules MCF-7dox, moyenne ± SEM, **p<0,01, ***p<0,001 (Mann-Whitney).

L'effet chimiosensibilisant du DHA dans les MCF-7dox implique le stress oxydant mitochondrial.

Nous avons ensuite cherché à déterminer si le stress oxydant mitochondrial était impliqué dans l'effet sensibilisant du DHA dans notre modèle d'étude (MCF-7dox). Pour cela, nous avons mesuré la viabilité des cellules cancéreuses MCF-7dox après supplémentation en DHA pendant 6 jours, en combinaison ou non avec un antioxydant mitochondrial, le MitoTEMPO.



Figure 42 : Effet chimiosensibilisant du DHA en présence d'un antioxydant mitochondrial spécifique (MitoTEMPO) sur les cellules MCF-7dox.

Test de chimiosensibilisation réalisé sur 7 jours. Les cellules MCF-7dox sont traitées avec 10 μ M de doxorubicine en combinaison ou non avec 30 μ M de DHA et 10 μ M de MitoTEMPO. Les résultats sont exprimés en % de viabilité par rapport au contrôle approprié. N = 5, moyenne ± SEM, *p<0,05, **p<0,01 (Mann-Whitney).

L'utilisation du MitoTEMPO a totalement annulé l'effet chimiosensibilisant du DHA dans les cellules MCF-7dox **Figure 42**. Ainsi, le pourcentage de viabilité des cellules MCF-7dox est significativement supérieur dans la condition DOX + DHA + MitoTempo ($61\% \pm 11\%$) en comparaison des conditions DOX + DHA ($28\% \pm 8\%$) ou DOX seule ($42\% \pm 4\%$). Ces résultats suggèrent que l'effet sensibilisant du DHA à la doxorubicine dans les cellules MCF-7dox implique un stress oxydant mitochondrial.

La supplémentation en DHA modifie la composition en acides gras des CL mais ne semble pas modifier la quantité de CL dans les cellules MCF-7 et MCF-7dox.

Nos résultats montrent qu'à l'état basal, la composition en acides gras des CL ne semble pas être différente entre les deux lignées **Tableau 16**. De plus, nos résultats montrent que 6 jours de traitement avec du DHA augmente fortement la quantité d'AGPI n-3. L'incorporation du DHA est supérieure dans les cellules MCF-7 en comparaison des cellules MCF-7dox. De plus, il est à noter qu'une supplémentation en DHA entraine aussi une augmentation de l'incorporation de l'EPA dans les CL des cellules (de 6,5 fois dans les cellules MCF-7 et de 2

	MCF-7	MCF-7 + DHA 30 μΜ	MCF-7dox	MCF-7dox +DHA 30 µM
Saturés (%)	40,6	28,4	39,2	48,5
Monoinsaturés (%)	26,8	35,0	31,6	25,1
Polyinsaturés (n-6 + n-3) (%)	13,6	21,9	16,9	19,4
Sommes des insaturés (%)	40,4	57,0	48,5	44,5
N-6 (%)	9,1	6,0	7,9	6,2
N-3 (%)	4,5	15,9 (x 3,5)	4,9	9,7 (2)
DHA (%)	2,0	9,1 (x 4,7)	4,1	8,5 (x 2)
EPA (%)	0,8	5,2 (x 6,5)	0,2	0,4 (x 2)
N-6/n-3 (%)	2,0	0,4	1,7	0,6

fois dans les cellules MCF-7dox). Il existe en effet une retroconversion du DHA en EPA (Park et al., 2016) **Tableau 16**.

Tableau 16 : Composition en acides gras des CL dans les mitochondries des cellules MCF-7 et MCF-7dox N = 2.

La figure 43 montre la quantité de CL contenue dans les deux lignées étudiées. La supplémentation en DHA ne semble pas modifier la quantité de CL contenue dans les mitochondries des cellules MCF-7 et MCF-7dox Figure 43.



Figure 43 : Quantité de CL contenue dans les mitochondries des cellules MCF-7 et MCF-7dox après supplémentation en DHA pendant 6 jours.

Quantification effectuée par méthode HPTLC sur mitochondries isolées. N = 2.

Le DHA induit une diminution de l'efficacité de la phosphorylation oxydative spécifiquement dans les cellules MCF-7dox.

Comme le système de phosphorylation oxydative mitochondriale est une des premières cibles du stress oxydant et son fonctionnement une des premières cibles d'un changement de la composition en acides gras des CL, nous avons ensuite étudié le métabolisme énergétique mitochondrial dans nos deux lignées cellulaires supplémentées ou non en DHA.

Nous résultats montrent qu'une supplémentation en DHA n'entraine pas de modification de l'efficacité de la synthèse d'ATP (rapport ATP/O) dans les cellules MCF-7 **Figure 44**. En revanche, cette efficacité est diminuée de manière significative dans les cellules MCF-7dox (-34%, 2,3 \pm 0,4 vs 1,6 \pm 0,4, p<0,01, **Figure 44**) ramenant celle-ci au niveau des cellules MCF-7.



Figure 44 : Mesure du rendement énergétique (ATP produit / Oxygène consommé) dans les cellules MCF-7 et MCF-7dox après une supplémentation en DHA pendant 6 jours.

Mesure du rendement énergétique des mitochondries des cellules MCF-7 et MCF-7dox supplémentées ou non en DHA 30 μ M. Mesure réalisée sur cellules perméabilisées. Substrats respiratoires : Glutamate (5 mM) + Malate (5 mM) + Succinate (10 mM) + ADP (1,5 mM). N = 10 pour les cellules MCF-7 et N = 8 pour les cellules MCF-7dox, moyenne ± SEM, **p<0,01 (Mann-Whitney).

Afin de déterminer la nature du gaspillage énergétique impliqué dans la meilleure efficacité de la synthèse d'ATP, nous avons mesuré la consommation d'oxygène en condition non-phosphorylante (slip redox ou fuite de protons). Comme observé dans la **Figure 45**, la consommation d'oxygène liée au gaspillage énergétique en condition non-phosphorylante n'est pas différente entre la condition témoin et la condition DHA $(1,7 \pm 0,9 \text{ vs } 1,7 \pm 0,5)$. De plus, la supplémentation en DHA n'induit pas de modification du potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules MCF-7dox traitées $(2,8 \pm 0,8 \text{ vs } 2,5 \pm 0,7, \text{$ **Figure 46**). Ces résultats suggèrent que le DHA pourrait induire une augmentation du gaspillage énergétique par un mécanisme qui toucherait l'ATP synthase (proton slip).



Figure 45 : Mesure de la consommation d'oxygène liée au gaspillage énergétique (slip redox ou proton leak) dans les cellules MCF-7dox après supplémentation ou non par le DHA durant 6 jours.

Mesure de la consommation d'oxygène sur cellules perméabilisées dans les mitochondries des cellules MCF-7dox supplémentées ou non en DHA 30 μ M. Substrats respiratoires : Glutamate (5 mM) + Malate (5 mM) + Succinate (10 mM) + ADP (1,5 mM) + oligomycine (5,25 μ g/mL). N = 5, moyenne ± SEM, (Mann-Whitney).

Figure 46 : Mesure du potentiel de membrane mitochondriale dans les cellules MCF-7dox après supplémentation ou non par le DHA durant 6 jours.

Mesure du potentiel de membrane mitochondriale dans les mitochondries des cellules MCF-7dox supplémentées ou non en DHA 30 μ M. Mesure réalisée sur cellules perméabilisées. Substrats respiratoires : Glutamate (5 mM) + Malate (5 mM) + Succinate (10 mM) + NAD⁺ (0,5 mM) + iodoacétate (2 mM) + ADP (1,5 mM) + sonde JC-1 (0,5 μ M). N = 7, moyenne, (Mann-Whitney).

Le DHA n'induit pas de modification de la glycolyse aérobie.

L'adaptation métabolique est une des caractéristiques impliquées dans la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents thérapeutiques. Comme la supplémentation en DHA entraine une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP, nous avons donc étudié le métabolisme glycolytique dans les cellules MCF-7 et MCF-7dox traitées ou non avec du DHA afin de voir une possible augmentation de la glycolyse en réponse à la diminution du rendement énergétique observée.

Nos résultats confirment les résultats obtenus dans l'article 1, c'est-à-dire que les cellules MCF-7 dox produisent plus de lactate que les cellules MCF-7 **Figure 47**. En revanche, la supplémentation en DHA n'induit pas de modification de la consommation de glucose ni de la

production de lactate dans les cellules traitées **Figure 47**. La supplémentation en DHA n'induit donc pas de modification de la glycolyse aérobie dans les cellules MCF-7 et MCF-7dox.



Figure 47 : Etude du profil métabolique des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MCF-7dox après une supplémentation par le DHA.

Mesure réalisé dans le milieur de culture. Mesure de la consommation de glucose et de la production de lactate en 24h dans les cellules MCF-7 et MCF-7dox supplémentées ou non en DHA 30 μ M. N = 10, moyenne \pm SEM, **p<0,01, (Mann-Whitney).

Il semble que la supplémentation en DHA malgré une diminution du rendement énergétique mitochondrial, n'induise pas de variation du taux d'ATP intracellulaire dans les cellules MCF-7dox ($21,1 \pm 0,1$ vs $21,4 \pm 2,3$, Figure 48).



Figure 48 : Contenu en ATP intracellulaire dans les cellules MCF-7dox.

Mesure de l'ATP intracellulaire en 24h dans les cellules MCF-7dox traitées ou non avec du DHA 30 μ M pendant 6 jours. N = 3, moyenne, (Mann-Whitney).
Le DHA n'induit pas de modification de l'accumulation mitochondriale de la doxorubicine dans les cellules MCF-7dox.

Comme l'efficacité de la synthèse d'ATP est diminuée dans les cellules MCF-7dox après supplémentation par le DHA et que nos résultats ont aussi montré que cette synthèse d'ATP participait à l'accumulation mitochondriale de la doxorubicine dans ces cellules (résultats de l'article 2), nous avons donc mesuré l'accumulation mitochondriale de la doxorubicine dans les cellules MCF-7dox après traitement par le DHA. Nos résultats montrent que la supplémentation en DHA ne semble pas induire de modification de l'accumulation de la doxorubicine dans les mitochondries des cellules MCF-7dox. En effet, que la mesure soit réalisée en absence d'énergie (-ADP/ATP) ou en présence d'énergie (+ADP/ATP), la quantité de doxorubicine accumulée dans la mitochondrie est très similaire entre la condition témoin et la condition +DHA

Figure 49.



Figure 49 : Accumulation intramitochondriale de la doxorubicine dans les mitochondries des cellules MCF-7dox après 6 jours de traitement par le DHA (30 μ M) ou sans traitement.

Mesure réalisée sur mitochondrie isolée après 30 minutes d'accumulation de la doxorubicine (5 μ M). N = 4, moyenne, (Mann-Whitney entre la condition témoin et la condition + DHA - Wilcoxson entre les conditions –ADP/ATP et +ADP/ATP de chaque groupes).

En conclusion, ces travaux ont pu montrer que la supplémentation en DHA sensibilise spécifiquement les cellules MCF-7dox à la doxorubicine et que cet effet chimiosensibilisant est annulé par l'utilisation d'un antioxydant mitochondrial (MitoTEMPO). Cette supplémentation s'accompagne d'une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP mitochondriale mais n'entraine pas de changements de la quantité en acides gras dans les CL spécifique aux cellules résistantes MCF-7dox.

Un régime nutritionnel enrichi en DHA/EPA modifie la quantité et la composition des CL de tumeurs mammaires.

En parallèle de cette étude *in vitro*, nous avons indirectement vérifié la pertinence de ces résultats en utilisant des tumeurs mammaires congelées issues d'une précédente étude réalisée au laboratoire. Pour cette étude *in vivo*, des rates ont reçu une injection de NMU afin d'induire des tumeurs mammaires puis les rates ont été réparties en deux groupes : un groupe régime « témoin » contenant 12% d'arachide et 3% de colza et un groupe régime « huile de poisson » contenant 8% d'arachide, 2% de colza et 5% d'huile de poisson (50% de DHA et 23% d'EPA) (Vibet et al., 2008). Les rates ont été nourries par ce régime nutritionnel pendant environ deux mois et demi. Nous avons mesuré la quantité de CL dans ces tumeurs mammaires ainsi que l'incorporation du DHA dans les CL. Notre analyse révèle qu'un régime enrichi en AGPI n-3 conduit à une augmentation de la quantité de CL présentes dans les tumeurs (+61%, $3,8 \pm 0,7$ vs $6,2 \pm 1$, p<0,01, **Figure 50**). L'analyse de la composition des tumeurs montrent qu'un régime alimentaire enrichi en AGPI n-3 conduit à une forte incorporation du DHA et de l'EPA dans les CL (DHA : x4, p<0,01 et EPA : x50, p<0,01, **Tableau 17**).



Figure 50 : Quantification des CL dans les tumeurs.

Mesure par HPTLC dans les CL de tumeurs mammaires chimio-induite. N = 6, moyenne, **p<0,01 (Mann-Whitney).

égime Témoin	Régime « huile de poisson »
37,2 ± 4,6	39,2 ± 4,7
29.1 ± 3.6	23.2 + 2.1

Saturés (%)	37,2 ± 4,6	39,2 ± 4,7
Monoinsaturés (%)	29,1 ± 3,6	23,2 ± 2,1
Polyinsaturés (n-6 + n-3) (%)	27 ± 4,8	28,1 ± 3,1
Sommes des insaturés (%)	29,1 ± 3,6	23,2 ± 2,1
n-6 (%)	25,5 ± 5,7	$20,2 \pm 4,7$
n-3 (%)	1,5 ± 0,6	7,9 ± 1,4
DHA (%)	1,1 ± 4,6	4,4 ± 4,6 (x 4)
EPA (%)	$0,03 \pm 4,6$	1,5 ± 4,6 (x 50)
n-6/n-3 (%)	17 ± 4,6	$2,5 \pm 4,6$

Tableau 17 : Composition en acides gras des CL dans un modèle de tumeurs mammaires chimio-induites

N = 5 pour le régime témoin et N = 6 pour le régime « huile de poisson », moyenne ± SEM.

c. Discussion et perspectives

Cette étude avait pour but de déterminer si le métabolisme énergétique mitochondrial et les CL étaient impliqués dans l'effet chimiosensibilisant du DHA à la doxorubicine. Nos résultats montrent que le DHA (1) augmente l'effet toxique de la doxorubicine dans les cellules cancéreuses résistantes MCF-7dox par un mécanisme impliquant le stress oxydant mitochondrial, (2) diminue le rendement de la conversion énergétique mitochondrial (rapport ATP/O) spécifiquement dans les cellules MCF-7dox probablement en modifiant le couplage de l'ATP synthase (proton slipping), (3) s'incorpore dans les CL entrainant ainsi une augmentation de la proportion d'AGPI n-3 dans ce phospholipide dans les lignées cellulaires sensibles et résistantes et (4) ne modifie pas le contenu en CL dans les mitochondries des cellules MCF-7dox.

Dans notre étude, la supplémentation en DHA induit un effet sensibilisant à la doxorubicine dans les cellules cancéreuses mammaires résistantes à la doxorubicine, MCF-7dox, sans affecter la viabilité des cellules cancéreuses mammaires sensibles, MCF-7. Ces résultats ont déjà été observé lors de précédents travaux réalisés au laboratoire (Mahéo et al., 2005). Dans cette précédente étude, l'effet sensibilisant du DHA dans les cellules cancéreuses était médié par un stress oxydant cellulaire. Cet AGPIn-3 de par ses nombreuses insaturations est une cible privilégiée des ERO et son incorporation dans les phospholipides membranaires majore la peroxydation lipidique et la cytotoxicité induite par la doxorubicine (Germain et al., 1998) et (Colas et al., 2005). Nos résultats complètent ces données puisqu'ils montrent que l'effet chimiosensibilisant du DHA à la doxorubicine implique un stress oxydant mitochondrial. En effet, l'utilisation du MitoTEMPO, un antioxydant ciblant spécifiquement la mitochondrie, annule l'effet sensibilisant du DHA à la doxorubicine dans les cellules MCF-7dox. Cette implication du stress oxydant mitochondrial dans les cellules MCF-7dox (et pas dans la lignée cellulaire sensible) pourrait être due à une diminution de l'expression de certaines enzymes antioxydantes mitochondriales comme démontré lors d'un traitement par les AGPI n--3 (Ding et al., 2004), (Hardman et al., 2001) et (Vibet et al., 2008).

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont rapportés que l'utilisation d'AGPI n-3 seul (sans molécules thérapeutiques) entraine une augmentation de la peroxydation lipidique au niveau des CL (Mouradian et al., 2015), (Fan et al., 2016) et (Watkins et al., 1998). En plus de son effet inhibiteur sur la topoisomérase II, la doxorubicine induit une production d'ERO au

niveau mitochondrial via sa réduction en radical semiquinone au niveau du complexe I (Doroshow et al., 1986). La présence de nombreuses insaturations au niveau des acides gras composant les CL et la localisation de ce phospholipide à proximité des sites de production des ERO mitochondriales font que ce phospholipide est sensible aux ERO. Ainsi, l'effet sensibilisant du DHA à la doxorubicine dans notre modèle cellulaire pourrait conduire à une augmentation de la quantité de CL peroxydées suite à son incorporation dans ce phospholipide. Il est cependant intriguant de constater que les effets du DHA sur la quantité d'acides gras moninsaturés et polyinsaturés y compris le DHA dans les CL ne sont sensiblement pas différents entre les cellules MCF-7 et les cellules MCF-7dox. Ce résultat suggère que la susceptibilité à la peroxydation des CL n'est peut-être pas différente entre les deux lignées cellulaires.

Un autre résultat important de cette étude est le fait que l'efficacité de la synthèse d'ATP (ATP/O) soit diminuée spécifiquement dans les MCF-7dox. Au final, le DHA réduit le rendement énergétique dans ces cellules au même niveau que le rendement observé dans les cellules MCF-7. Cet effet semble impliquer un mécanisme touchant l'ATP synthase et entrainant une diminution du rapport H⁺/ATP. Cette diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP mitochondriale pourrait induire une diminution du contenu en ATP synthétisé et disponible pour le fonctionnement des pompes d'efflux mitochondriales (résultats de l'article 2) ou encore pour le maintien des voies de survie cellulaire. Néanmoins des résultats préliminaires montrent que la supplémentation en DHA ne semble pas induire de modification de l'accumulation intramitochondriale de la doxorubicine des cellules MCF-7dox. Ces résultats semblent en accord avec de précédents résultats du laboratoire qui montrent que la supplémentation en DHA n'induit pas de changement de fonctionnement du transporteur P-gp au niveau de la membrane plasmique (Mahéo et al., 2005). Il n'est cependant pas exclu que la quantité d'ATP nécessaire pour le fonctionnement des pompes d'efflux présentes dans les mitochondries des cellules MCF-7dox soit apportée par la glycolyse qui n'est pas diminuée dans notre étude suite à la supplémentation en DHA.

Deux principaux mécanismes expliquent le gaspillage énergétique durant la phosphorylation oxydative (1) une fuite de protons à travers la membrane mitochondriale (proton leak) ou (2) une modification de l'efficacité des pompes à protons (redox slipping par le complexe I, III ou IV ou proton slipping par l'ATP synthase). Le « proton leak » et le « redox slipping » se détermine en condition non-phosphorylante à la différence du « proton slipping » qui concerne le fonctionnement de l'ATP synthase. Nos résultats ne montrent pas d'effet du

DHA sur la consommation d'oxygène en condition non-phosphorylante. Ceci exclu une majoration du « proton leak » ou du « redox slipping ». Il semble donc que la diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP induite par le DHA dans les cellules MCF-7dox soit plutôt la conséquence d'une augmentation du « proton slipping ». Ce mécanisme est caractérisé par une modification du ratio H⁺/ATP se traduisant par un retour des protons dans la matrice mitochondriale par l'ATP synthase mais non associé avec une synthèse d'ATP. Ce possible mécanisme semble impliquer la partie F0 de l'ATP synthase (la partie F0 étant responsable de la conduction des protons vers la matrice mitochondriale) (Kadenbach, 2003).

La présence d'un stress oxydant mitochondrial indépendamment de la peroxydation lipidique des CL est connue pour affecter l'efficacité de la synthèse d'ATP (Negre-Salvayre et al., 1997) et (Brand et al., 2004). Le rendement de la conversion énergétique est aussi influencé par la quantité et la composition en acides gras des CL. Ainsi une diminution de la quantité de CL est associée à une augmentation de l'efficacité de synthèse d'ATP mitochondrial (Paradies et al., 1991) et (Peyta et al., 2016). A l'inverse une augmentation de cette quantité est associée à une diminution du rendement énergétique (Dumas et al., 2011) et (Julienne et al., 2014). Dans notre modèle cellulaire, en condition basale, les mitochondries des cellules MCF-7dox contiennent moins de CL que les mitochondries des cellules MCF-7 et ceci est corrélé avec une augmentation de leur rendement énergétique (ATP/O) (résultats de l'article 2). La supplémentation en DHA dans les cellules MCF-7dox ne semble pas avoir d'effet sur le contenu en CL dans les mitochondries. Une augmentation de l'incorporation des acides gras saturés dans les CL conduit à une augmentation de l'activité de l'ATP synthase (Fontaine et al., 1996), tandis qu'une augmentation de l'incorporation d'acides gras polyinsaturés (diminution du ratio n-6/n-3) conduit à une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP (Dumas et al., 2011). Nos résultats montrent que la supplémentation en DHA conduit à une forte incorporation de celui-ci au niveau des CL (contenu doublé sous supplémentation pendant 6 jours) ainsi qu'à une diminution du ratio n-6/n-3 contenu dans les CL. Cependant là encore, ces effets ne sont pas spécifiques des MCF-7dox contrairement à l'effet du DHA sur la diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP.

Dans cette étude, nous avons aussi pu montrer qu'un régime alimentaire enrichi en « huile de poisson » conduit à une forte incorporation du DHA dans les CL de tumeurs mammaires. Au cours de ces dernières années, l'étude du DHA a généré un grand intérêt en raison de sa capacité à réduire la résistance aux anthracyclines des tumeurs mammaires chez le rongeurs (Bougnoux et al., 2010) et (Murphy et al. 2011). Le DHA est une cible préférentielle des attaques des radicaux libres tels que ceux générés par les anthracyclines. Ainsi une plus forte incorporation de ce lipide dans les CL de tumeurs pourrait conduire à une diminution de la croissance tumorale.

Dans cette étude, l'effet du DHA sur la mort cellulaire n'a pas été abordé. Dans un contexte de stress oxydant engendré par un traitement par la doxorubicine, une augmentation de la sensibilité des CL à la peroxydation pourrait entrainer une perte du complexe CL-cytochrome c. Cette modification du complexe pourrait déclencher la mort cellulaire par apoptose de manière plus rapide dans les cellules MCF-7dox. Afin de vérifier cette hypothèse, il devra être dosé, dans les mitochondries des cellules MCF-7dox sous traitement doxorubicine en association ou non avec une supplémentation en DHA : le relargage du cytochrome c et l'activité de la caspase 9 et des caspases 3 et 7.

L'augmentation de la peroxydation lipidique des CL pourrait aussi entrainer leur translocation au niveau de la membrane externe mitochondriale ou elles pourraient servir de plateforme d'activation de la protéine pro-apoptotique tBid (Paradies et al., 2014). Cette présence au niveau de la membrane externe pourrait aussi servir de signal pour le déclenchement du processus de mitophagie (Hsu et al., 2016).

Les différents mécanismes pouvant expliquer l'effet sensibilisant du DHA spécifiquement dans les MCF-7dox sont expliqués dans la Figure 51.



Figure 51 : Mécanismes possibles de sensibilisation du DHA dans les cellules Mcf-7dox.

Chapitre IV : Conclusion et perspectives générales

Ce travail de thèse avait pour objectif général d'étudier le rôle du métabolisme énergétique mitochondrial et des cardiolipines (CL) dans la réponse des cellules cancéreuses mammaires à la doxorubicine dans le but d'identifier des cibles/mécanismes de ces métabolismes impliqués dans la résistance à cet agent thérapeutique.

Nos résultats montrent que dans les mitochondries des cellules cancéreuses mammaires résistantes (MCF-7dox) (1) l'efficacité de la synthèse d'ATP (ATP/O) est meilleure, (2) l'activité du complexe I est diminuée et (3) la quantité de CL est inférieure.

Une meilleure efficacité de la synthèse d'ATP mitochondriale signifie que la mitochondrie est capable de produire la même quantité d'ATP en consommant moins d'oxygène ou de produire une quantité plus importante d'ATP pour une même consommation d'oxygène. Dans nos conditions, il semble que les mitochondries des cellules MCF-7dox soient capables de produire plus d'ATP puisque la consommation d'oxygène dédiée à la synthèse d'ATP est identique en comparaison des mitochondries des cellules MCF-7. Nos résultats suggèrent que cette meilleure capacité de synthèse d'ATP mitochondriale permettrait d'optimiser le fonctionnement des pompes d'efflux ATP-dépendante présentes dans les mitochondries des cellules MCF-7dox. En effet, ce travail de thèse est le premier (à notre connaissance), à montrer la présence simultanée de deux transporteurs d'efflux (BCRP et MRP1) au sein des mitochondries, dont l'activité est en partie dépendante de la synthèse d'ATP mitochondriale, dans un modèle de cellule cancéreuse mammaire résistante à la doxorubicine.

Dans notre étude, l'utilisation du FCCP qui induit une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP mitochondriale n'a pas d'effet sur la sensibilité des cellules MCF-7dox à la doxorubicine. Nos résultats suggèrent que l'ATP produit par la glycolyse pourrait compenser la moindre quantité d'ATP produite par la mitochondrie avec un traitement par le FCCP. Afin de déterminer la part de l'ATP glycolytique dans le fonctionnement de ces transporteurs mitochondriaux, il serait intéressant de cibler le métabolisme glycolytique par l'utilisation d'inhibiteurs comme lonadimine ou le 3-bromopyruvate (inhibiteurs de l'hexokinase 2).

Bien que nos résultats montrent que la présence et le fonctionnement de ces pompes diminuent l'accumulation intramitochondriale de la doxorubicine dans les cellules MCF-7dox, il semble nécessaire de montrer que cet effet participe réellement à la résistance de ces cellules à la doxorubicine en testant les conséquences de cette moindre accumulation de la drogue sur l'ouverture du mPTP et/ou le relargage du cytochrome c et/ ou la mort cellulaire. Pour cela, la mesure de l'ouverture du mPTP sur mitochondries isolées pourra être envisageable après accumulation de la doxorubicine en combinaison ou non avec les inhibiteurs des pompes d'efflux. Le relargage du cytochrome c pourra être réalisé par mesure de son expression protéique dans la fraction mitochondriale après accumulation de doxorubicine par la technique de Western-blotting. La mesure de l'activation de la caspase 9 (apoptose intrinsèque) pourra aussi être envisagée par la même approche.

L'utilisation d'autres lignées cancéreuses résistantes à la doxorubicine pourraient être envisagée afin de vérifier si l'expression de ces deux transporteurs est un point commun dans la résistance à la doxorubicine.

Nous montrons également que l'activité du complexe I de la chaine respiratoire des cellules MCF-7dox est diminuée et que ceci pourrait participer à la résistance de ces cellules à la doxorubicine. En effet, cette diminution de l'activité du complexe I est associée à une réduction du cycle redox de la doxorubicine, entrainant une plus faible production d'ERO et donc une ouverture du mPTP retardée sous le stress oxydant lié à la doxorubicine. D'autre part, nos résultats montrent que les cellules MCF-7 traitées par la roténone présentent une diminution de l'activité de leur complexe I associée à un cycle redox de la doxorubicine. La mesure de l'ouverture du mPTP dans ces cellules doit être envisagée afin d'établir un lien entre la diminution de l'activité du complexe I et la résistance observée de ces cellules à la doxorubicine.

Enfin, nos résultats montrent que le métabolisme des CL est particulier dans les cellules MCF-7dox en comparaison de celui des MCF-7. En effet, la quantité de CL est diminuée et celle de la forme intermédiaire monolysocardiolipine (MLCL) est augmentée dans les cellules MCF-7dox. Ceci étant probablement la conséquence d'une activité plus faible de la cardiolipine synthase et de la tafazzine. Il est très probable que la diminution de la quantité de CL soit à l'origine de la meilleure efficacité de la synthèse d'ATP observée dans les cellules MCF-7dox et de la diminution de l'activité du complexe I en jouant directement ou indirectement sur l'assemblage de ce complexe. Néanmoins, il est également connu que la quantité de MLCL a des conséquences sur la phosphorylation oxydative. Dans les études, il n'est pas toujours très clair de déterminer si le rôle des CL est plus important que celui des MLCL (Gonzalvez et al., 2013). Il serait donc intéressant de préciser les liens de causalité entre tous ces paramètres. Dans un premier temps, une augmentation du contenu en CL dans les cellules MCF-7dox pourra être envisagée par l'utilisation de liposomes (technique déjà présente au laboratoire (Julienne et al.,

2014). Ces liposomes pourraient contenir des quantités variées de CL afin de pouvoir potentiellement établir une corrélation entre la quantité de CL présente dans les mitochondries et la sensibilité des cellules MCF-7dox à la doxorubicine. A l'inverse, une diminution du contenu en CL peut aussi être envisagée dans les cellules MCF-7 par l'utilisation d'un siARN ciblant la cardiolipine synthase ou la tafazzine (enzyme impliquée dans le remodelage des CL).

L'étude du réseau mitochondrial dans les cellules cancéreuses résistantes pourrait aussi être envisagée. En effet, il a récemment été démontré que la doxorubicine pouvait altérer la dynamique mitochondriale de mitochondries hépatiques. Dans cette étude l'utilisation de la doxorubicine entraine une diminution des protéines régulant la fusion mitochondriale (OPA1, Mfn 1/2) (Dirks-Naylor et al., 2014). D'autre part, les CL semblent être en lien avec cette dynamique mitochondriale. En effet, la carence en CL semble conduire à l'apparition d'un réseau mitochondrial plus fragmenté (Frohman, 2015). Dans nos modèles cellulaires, il est donc attendu que les cellules MCF-7dox présentent un réseau mitochondrial fragmenté en comparaison des cellules MCF-7. Diverses approches pourront être envisagées afin d'étudier ce réseau dans nos deux modèles cellulaires comme la mesure de l'expression protéique des différentes protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale, ainsi que l'utilisation de sonde de type MitoTracker afin de visualiser le réseau mitochondrial par approche microscopique. Enfin il est probable que la moindre quantité de cardiolipines dans les cellules MCF-7dox joue aussi un rôle dans une moindre accumulation de la doxorubicine dans les mitochondries de ces cellules. En effet, les cardiolipines ont une forte affinité pour la doxorubicine. Afin de vérifier ce dernier point, il pourra être envisagé de mesurer l'accumulation de la doxorubicine dans les mitochondries des cellules MCF-7dox préalablement enrichies en CL.

Les différents résultats de ce travail de thèse permettent de proposer le schéma suivant concernant les mitochondries des cellules MCF-7dox **Figure 52** :



Figure 52 : Schéma hypothétique du fonctionnement du métabolisme énergétique mitochondrial dans les cellules MCF-7dox suite à ce travail de thèse.

La diminution de la quantité de cardiolipines (CL) entrainerait une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire suite à une déstabilisation des supercomplexes et à la diminution de l'assemblage du complexe I. Indépendamment ou pas de cette diminution de l'activité du complexe I, cette diminution de la quantité de CL (1) augmenterait le rendement énergétique (rapport ATP/O) entrainant ainsi une moindre accumulation de la doxorubicine dans les mitochondries et (2) induirait une diminution de la réduction de la doxorubicine par le complexe I, une diminution de la production d'ERO et une moindre ouverture du mPTP. Ces deux phénomènes pourraient ainsi expliquer partiellement la résistance des cellules MCF-7dox à la doxorubicine.

L'amélioration de l'efficacité des traitements thérapeutiques par l'utilisation d'acides gras polyinsaturés n-3 est depuis longtemps étudiée au laboratoire. Nos différentes données démontrent qu'in vitro et in vivo le DHA (acide docosahexaénoïque 22 :6n-3) augmente l'effet toxique des anthracyclines sans majoration des effets secondaires via un mécanisme impliquant le stress oxydant (Germain et al., 1998), (Mahéo et al., 2005) et (Colas et al., 2005). De manière très intéressante, dans cette étude cet effet est spécifique des cellules résistantes MCF-7dox. De plus, la supplémentation en DHA conduit à une augmentation de son incorporation dans les phospholipides cellulaires et notamment comme nous l'avons montré également au niveau des CL. Le 3^{ème} objectif spécifique de ces travaux de thèse était donc de déterminer si l'effet sensibilisant du DHA impliquait des changements du métabolisme énergétique mitochondrial et/ou du métabolisme des CL dans le but d'identifier des cibles/mécanismes impliqués dans la résistance des cellules cancéreuses mammaires à la doxorubicine sensibles au DHA. L'effet sensibilisant du DHA (1) implique un stress oxydant mitochondrial, (2) s'accompagne d'une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP mitochondriale dans les cellules MCF-7dox et (3) induit des modifications de la composition en acides gras des CL dans les cellules MCF-7dox mais également dans les cellules MCF-7, (4) n'induit pas de variation de la quantité de CL dans les cellules MCF-7dox.

L'effet sensibilisant du DHA impliquant un stress oxydant mitochondrial, il serait intéressant de doser la quantité des CL peroxydées, par spectrométrie de masse, dans les mitochondries des cellules MCF-7dox. L'incorporation du DHA dans les autres phospholipides mitochondriaux pourra aussi être envisagée ainsi que la mesure de leur état de peroxydation puisque les CL ne sont pas les seuls phospholipides dans lesquels le DHA peut s'incorporer. Il a aussi été démontré que le DHA peut induire une diminution de l'expression de certaines enzymes antioxydantes comme la GPx4 ou la SOD1 (Ding et al., 2004) et (Ding et al., 2007). Il serait donc intéressant de quantifier l'expression et l'activité des enzymes antioxydantes mitochondriales comme la Gpx4 ou encore la Mn-SOD dans nos modèles cellulaires afin de voir si la supplémentation en DHA induit une diminution de la toxicité de la doxorubicine et l'implication du stress oxydant mitochondrial dans cette sensibilisation. Bibliographie

- Abdi, J., Garssen, J., Faber, J., & Redegeld, F. A. (2014). Omega-3 fatty acids, EPA and DHA induce apoptosis and enhance drug sensitivity in multiple myeloma cells but not in normal peripheral mononuclear cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(12), 1254–62.
- Acehan, D., Malhotra, A., Xu, Y., Ren, M., Stokes, D. L., & Schlame, M. (2011). Cardiolipin affects the supramolecular organization of ATP synthase in mitochondria. *Biophysical Journal*, 100(9), 2184–92.
- Acin-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008).
 Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, 32(4), 529–39.
- Acin-Perez, R., & Enriquez, J. A. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochimica & Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(4), 444–50.
- Agnihotri, N., Sharma, G., Rani, I., & Bhatnagar, A. (2016). Fish oil prevents colon cancer by modulation of structure and function of mitochondria. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82, 90-7.
- Aichler, M., Elsner, M., Ludyga, N., Feuchtinger, A., Zangen, V., Maier, S. K., & Walch, A.
 K. (2013). Clinical response to chemotherapy in oesophageal adenocarcinoma patients is linked to defects in mitochondria. *Journal of Pathology*, 230(4), 410–19.
- Akada, M., Crnogorac-Jurcevic, T., Lattimore, S., Mahon, P., Lopes, R., Sunamura, M., & Lemoine, N. R. (2005). Intrinsic Chemoresistance to Gemcitabine Is Associated with Decreased Expression of BNIP3 in Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(8), 3094-101.
- Alakhova, D. Y., Rapoport, N. Y., Batrakova, E. V, Timoshin, A. A., Li, S., Nicholls, D., & Kabanov, A. V. (2010). Differential metabolic responses to pluronic in MDR and non-MDR cells: a novel pathway for chemosensitization of drug resistant cancers. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 142(1), 89–100.
- Aoun, M., Fouret, G., Michel, F., Bonafos, B., Ramos, J., Cristol, J. P., & Feillet-Coudray, C. (2012). Dietary fatty acids modulate liver mitochondrial cardiolipin content and its fatty acid composition in rats with non alcoholic fatty liver disease. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, 44(4), 439–52.
- Arcamone, F., Cassinelli, G., Faktini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., & Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from S. peucetieus var. caesius. *Biotechnology & Bioengineering*, 11(6), 1101–110.

- Ashley, N., & Poulton, J. (2009). Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 378(3), 450– 55.
- Bazàn, S., Mileykovskaya, E., Mallampalli, V. K. P. S., Heacock, P., Sparagna, G. C., & Dowhan, W. (2013). Cardiolipin-dependent reconstitution of respiratory supercomplexes from purified Saccharomyces cerevisiae complexes III and IV. *Journal of Biological Chemistry*, 288(1), 401–11.
- Behrend, L., Henderson, G., & Zwacka, R. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society Transcations*, *31*(Pt6), 1441–444.
- Bellance, N., Lestienne, P., & Rossignol, R. (2009). Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14(complex V), 4015–34.
- Benchekroun, M. N., Sinha, B. K., & Robert, J. (1993). Doxorubicin-induced oxygen free radical formation in sensitive and doxorubicin-resistant variants of rat glioblastoma cell lines. *FEBS Letters*, 326(1–3), 302–05.
- Bernardi, P. (2013). The mitochondrial permeability transition pore: A mystery solved? *Frontiers in Physiology, 4 MAY*(May), 1–12.
- Bernardi, P., & Penzo, D. (2002). Mitochondrial energy dissipation by fatty acids. Mechanisms and implications for cell death., *Vitamins & Hormones*, 65, 97-126.
- Beyer, K., & Klingenberg, M. (1985). ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by 31P nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 24(15), 3821–6.
- Bianchi, C., Bagnato, A., Paggi, M. G., & Floridi, A. (1987). Effect of Adriamycin on Electron Transport in Rat Heart, Liver, and Tumor Mitochondrial. *Experimental & Molecular Pathology*, 46(1), 123-35.
- Bione, S., D'Adamo, P., Maestrini, E., Gedeon, A. K., Bolhuis, P. A., & Toniolo, D. (1996). A novel X-linked gene, G4.5. is responsible for Barth syndrome. *Nature Genetics*, 12(4), 385–89.
- Blanchi, C., Genova, M. L., Castelli, G. P., & Lenaz, G. (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: Kinetic evidence using flux control analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36562–69.

- Bleier, L., & Dröse, S. (2013). Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. *Biochimica & Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(11–12), 1320–31.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), 911–17.
- Bobyleva V., Bellei M., Loredana, T., Pazienza and Muscatello, U. (1997). Effect of Cardiolipin on Functional Properties of Isolated Rat Liver Mitochondria, *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 41(3), 469–80.
- Bohnert, M., Pfanner, N., & van der Laan, M. (2007). A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. *FEBS Letters*, *581*(15), 2802–10.
- Borner, C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*, *39*(11), 615–47.
- Bougnoux, P., Giraudeau, B., & Couet, C. (2006). Diet, Cancer, and the Lipidome. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 15*(3), 416–21.
- Bougnoux, P., Hajjaji, N., & Couet, C. (2010). Lipides et cancer du sein : de la prévention au traitement. *Médecine Clinique Endocrinologie & Diabète*, 45, 42–47.
- Bougnoux, P., Hajjaji, N., Ferrasson, M. N., Giraudeau, B., Couet, C., & Le Floch, O. (2009).
 Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid:
 a phase II trial. *British Journal of Cancer*, *101*(12), 1978–85.
- Bouillaud, F., Alves-Guerra, M. C., & Ricquier, D. (2016). UCPs, at the interface between bioenergetics and metabolism. *Biochimica & Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(10), 2443–64.
- Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., Pakay, J. L., & Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(6), 755–67.
- Brand, M. D., Pakay, J. L., Ocloo, A., Kokoszka, J., Wallace, D. C., Brookes, P. S., & Cornwall,
 E. J. (2005). The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *The Biochemical Journal*, *392*(Pt 2), 353–62.
- Brand, M. D., Turner, N., Ocloo, A., Else, P. L., & Hulbert, A. J. (2003). Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *The Biochemical Journal*, 376(Pt 3), 741–8.

- Brookins Danz, E. D., Skramsted, J., Henry, N., Bennett, J. A., & Keller, R. S. (2009). Resveratrol prevents doxorubicin cardiotoxicity through mitochondrial stabilization and the Sirt1 pathway. *Free Radical Biology & Medicine*, 46(12), 1589–97.
- Brustovetsky, N., & Klingenberg, M. (1996). Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca2+. *Biochemistry*, *35*(26), 8483–88.
- Cannon, B., Shabalina, I. G., Kramarova, T. V., Petrovic, N., & Nedergaard, J. (2006). Uncoupling proteins: A role in protection against reactive oxygen species-or not? *Biochimica & Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1757(5–6), 449–58.
- Cao, J., Liu, Y., Lockwood, J., Burn, P., & Shi, Y. (2004). A Novel Cardiolipin-remodeling Pathway Revealed by a Gene Encoding an Endoplasmic Reticulum-associated Acyl-CoA:Lysocardiolipin Acyltransferase (ALCAT1) in Mouse*. *The Journal of Biological Chemsitry*, 279(30), 31727-34.
- Cardoso, S., Santos, R. X., Carvalho, C., Correia, S., Pereira, G. C., Pereira, S. S., & Moreira,
 P. I. (2008). Doxorubicin increases the susceptibility of brain mitochondria to Ca 2+ induced permeability transition and oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 45(10), 1395–1402.
- Ceh-Pavia, E., Spiller, M. P., & Lu, H. (2013). Folding and biogenesis of mitochondrial small Tim proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(8), 16685–705.
- Chamberlain, G. R., Tulumello, D. V, & Kelley, S. O. (2013). Targeted Delivery of Doxorubicin to Mitochondria. *ACS Chemical Biology*, 8(7), 1389-95.
- Chauvin, L., Goupille, C., Blanc, C., Pinault, M., Domingo, I., Guimaraes, C., & Mahéo, K. (2016). Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids increase the efficacy of docetaxel in mammary cancer cells by downregulating Akt and PKCε/δ-induced ERK pathways. *Biochimica & Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(4), 380–90.
- Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., & Li, J. (2015). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Letters*, *370*(1), 153-64.
- Chicco, A. J., & Sparagna, G. C. (2007). Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *American Journal of Physiology*, 292(1), C33-44.
- Choudhuri, S., & Klaassen, C. D. (2006). Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *International Journal of Toxicology*, 25(4), 231–29.

- Chourasia, A. H., Boland, M. L., & Macleod, K. F. (2015). Mitophagy and cancer. *Cancer & Metabolism*, 3:4, 11.
- Ciscato, F., Sciacovelli, M., Villano, G., Turato, C., Bernardi, P., Rasola, A., & Pontisso, P. (2014). SERPINB3 protects from oxidative damage by chemotherapeutics through inhibition of mitochondrial respiratory complex I. *Oncotarget*, 5(9), 2418–27.
- Claypool, S. M., Oktay, Y., Boontheung, P., Loo, J. A., & Koehler, C. M. (2008). Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane. *Journal of Cell Biology*, 182(5), 937-50.
- Cocco, T., Pacelli, C., Sgobbo, P., & Villani, G. (2009). Control of OXPHOS efficiency by complex I in brain mitochondria. *Neurobiology of Aging*, *30*(4), 622-9.
- Colas, S., Germain, E., Arab, K., Goupille, C., & Bougnoux, P. (2005). Alpha(tocopherol suppresses mammary tumor sensitivity to anthracyclins in fish oil-fed rats. *Nutrition & Cancer*, 51(2), 178-83.
- Colquhoun, A., & Schumacher, R. I. (2001). α-Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. *Biochimica & Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1533(3), 207–19.
- D'Eliseo, D., & Velotti, F. (2016). Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. *Journal of Clinical Medicine*, 5(2).
- Dalla Pozza, E., Fiorini, C., Dando, I., Menegazzi, M., Sgarbossa, A., Costanzo, C., & Donadelli, M. (2012). Role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cancer cell resistance to gemcitabine. *Biochimica & Biophysica Acta*, 1823(10), 1856–63.
- Daum, G., & Vance, J. E. (1997). Import of lipids into mitochondria. *Progress in Lipid Research*, 36(2–3), 103–30.
- Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (2006). Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Letters*, 580(4), 1103–11.
- Deeley, R., Westlake, C., & Cole, S. (2006). Transmembrane transport of endo-and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiological Reviews*, 86(3), 849–99.
- Denise, C., Paoli, P., Calvani, M., Taddei, M. L., Giannoni, E., Kopetz, S., & Chiarugi, P. (2015). 5-Fluorouracil resistant colon cancer cells are addicted to OXPHOS to survive and enhance stem-like traits. *Oncotarget*, 6(39), 41706–21.

- Derdak, Z., Mark, N. M., Beldi, G., Robson, S. C., Wands, J. R., & Baffy, G. (2008). The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells.*Cancer Research*, 68(8), 2813-9.
- Dhar, S. K., & St. Clair, D. K. (2012). Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, 52(11–12), 2209–22.
- Dirks-Naylor, A. J., Kouzi, S. A., Bero, J. D., Phan, D. T., Taylor, H. N., Whitt, S. D., & Mabolo, R. (2014). Doxorubicin alters the mitochondrial dynamics machinery and mitophagy in the liver of treated animals. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 28(6), 633-42.
- Di Paola, M., & Lorusso, M. (2006). Interaction of free fatty acids with mitochondria: Coupling, uncoupling and permeability transition. *Biochimica & Biophysica Acta Bioenergetics*, *1757*(9–10), 1330–37.
- Ding, W.-Q., & Lind, S. E. (2007). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a role in protecting cancer cells from docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(4), 1467–74.
- Ding, W.-Q., Vaught, J. L., Yamauchi, H., & Lind, S. E. (2004). Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity: the potential importance of down-regulation of superoxide dismutase 1 expression. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(9), 1109–17.
- Divakaruni, A. S., & Brand, M. D. (2011). The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 26(3), 192–205.
- Doroshow, J. H., & Davies, K. J. A. (1986). Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *Journal of Biological Chemistry*, 261(7), 3068–74.
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V, Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15665–70.
- Dröse, S., Zwicker, K., & Brandt, U. (2002). Full recovery of the NADH:ubiquinone activity of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from Yarrowia lipolytica by the addition of phospholipids. *Biochimica & Biophysica Acta Bioenergetics*, 1556(1), 65–72.

- Dumas, J. F., Goupille, C., Julienne, C. M., Pinault, M., Chevalier, S., Bougnoux, P., Servais, S., & Couet, C. (2011). Efficiency of oxidative phosphorylation in liver mitochondria is decreased in a rat model of peritoneal carcinosis. *Journal of Hepatology*, 54(2), 320–27.
- Fahrmann, J. F., & Hardman, W. E. (2013). Omega 3 fatty acids increase the chemo-sensitivity of B-CLL-derived cell lines EHEB and MEC-2 and of B-PLL-derived cell line JVM-2 to anti-cancer drugs doxorubicin, vincristine and fludarabine. *Lipids in Health and Disease*, 12, 36.
- Fairchild, C. R., Ivy, S. P., Whang-peng, J., Rosen, N., Israel, M. A., Melera, P. W., & Goldsmith, M. E. (1987). Isolation of amplified and overexpressed DNA sequences from adriamycin-resistant human breast cancer cells, *Cancer Research*, 47(19), 5141–48.
- Fan, Y. Y., Ran, Q., Toyokuni, S., Okazaki, Y., Callaway, E. S., Lupton, J. R., & Chapkin, R. S. (2011). Dietary fish oil promotes colonic apoptosis and mitochondrial proton leak in oxidatively stressed mice. *Cancer Prevention Research*, 4(8), 1267–74.
- Fan, Y.-Y., Vaz, F. M., & Chapkin, R. S. (2016). Dietary fat and fiber interactively modulate apoptosis and mitochondrial bioenergetic profiles in mouse colon in a site-specific manner. *European Journal of Cancer Prevention*, 10.
- Fanciulli, M., Bruno, T., Giovannelli, A., Gentile, F. P., Di Padova, M., Rubiu, O., & Floridi, A. (2000). Energy metabolism of human LoVo colon carcinoma cells: Correlation to drug resistance and influence of lonidamine. *Clinical Cancer Research*, 6(4), 1590–97.
- Floridi, A., Bruno, T., Miccadei, S., Fanciulli, M., Federico, A., & Paggi, M. G. (1998). Enhancement of Doxorubicin Content by the Antitumor Drug Lonidamine in Resistant Ehrlich Ascites Tumor Cells through Modulation of Energy Metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 56(7), 841-9.
- Fontaine, E., Eriksson, O., Ichas, F., & Bernardi, P. (1998). Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(20), 12662– 68.
- Fontaine, E. M., Moussa, M., Devin, A., Garcia, J., Ghisolfi, J., Rigoulet, M., & Leverve, X.
 M. (1996). Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochimica & Biophysica Acta*, *1276*, 181–87.
- Frohman, M. A. (2015). Role of mitochondrial lipids in guiding fission and fusion. *Journal of Molecular Medicine*, 93(3), 263-9.

- Fry, M., & Green, D. E. (1981). Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *Journal of Biological Chemistry*, 256(4), 1874– 80.
- Fu, A., Ma, S., Wei, N., Xiao, B., Tan, X., Tan, E. Y., & Qian, K. (2016). High expression of MnSOD promotes survival of circulating breast cancer cells and increases their resistance to doxorubicin, *Oncotarget*, 7(31).
- Gao, K., Liang, Q., Zhao, Z.-H., Li, Y.-F., & Wang, S.-F. (2016). Synergistic anticancer properties of docosahexaenoic acid and 5-fluorouracil through interference with energy metabolism and cell cycle arrest in human gastric cancer cell line AGS cells. *World Journal of Gastroenterology*, 22(10), 2971.
- Germain, E., Chajes, V., Cognault, S., Lhuillery, C., & Bougnoux, P. (1998). Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231 : relationship to lipid peroxidation. *International Journal of Cancer*, 75(4), 578-83.
- Giros, A., Grzybowski, M., Sohn, V. R., Pons, E., Fernandez-Morales, J., Xicola, R. M., & Llor, X. (2009). Regulation of colorectal cancer cell apoptosis by the n-3 polyunsaturated fatty acids docosahexaenoic and eicosapentaenoic. *Cancer Prevention Research*, 2(8), 732–42.
- Grivennikova, V. G., & Vinogradov, A. D., (2006). Generation of superoxide by complex I. *Biochimical & Biophysica Acta, 1757*(5-6), 553-61.
- Gomez, B., & Robinson, N. C. (1999). Phospholipase Digestion of Bound Cardiolipin Reversibly Inactivates Bovine Cytochrome bc 1. *Biochemistry*, 38(28), 9031-38.
- Gonzalvez, F., D'Aurelio, M., Boutant, M., Moustapha, A., Puech, J. P., Landes, T., & Petit, P. X. (2013). Barth syndrome: Cellular compensation of mitochondrial dysfunction and apoptosis inhibition due to changes in cardiolipin remodeling linked to tafazzin (TAZ) gene mutation. *Biochimica & Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*, 1832(8), 1194–206.
- Goormaghtigh, E., Brasseur, R., & Ruysschaert, J. M. (1982). Adriamycin inactivates cytochrome c oxidase by exclusion of the enzyme from its cardiolipin essential environment. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, *104*(1), 314-20.
- Goormaghtigh, E., Huart, P., Brasseur, R., & Ruysschaert, J. M. (1986). Mechanism of inhibition of mitochondrial enzymatic complex I-III by adriamycin derivatives. *Biochimica & Biophysica Acta - Biomembranes*, 861(C), 83–94.

- Goormaghtigh, E., Pollakis, G., & Ruysschaert, J. M. (1983). Mitochondrial membrane modifications induced by adriamycin-mediated electron transport. *Biochemical Pharmacology*, 328300(5), 889–93.
- Gosalvez, M., Blanco, M., Hunter, J., Miko, M., & Chance, B. (1974). Effects of anticancer agents on the respiration of isolated mitochondria and tumor cells. *European Journal of Cancer* (1965), 10(9), 567–74.
- Granci, V., Cai, F., Lecumberri, E., Clerc, A., Dupertuis, Y. M., & Pichard, C. (2013). Colon cancer cell chemosensitisation by fish oil emulsion involves apoptotic mitochondria pathway. *British Journal of Nutrition*, 109(7), 1188-95.
- Green, D. R., & Llambi, F. (2002). Cell Death Signaling, 2002.
- Grivennikova, V. G., & Vinogradov, A. D. (2006). Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*, 1757(5–6), 553–61.
- Hackenbrock, C. R., Chazotte, B., & Gupte, S. S. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *Journal* of Bioenergetics and Biomembranes, 18(5), 331–68.
- Han, M., Vakili, M. R., Soleymani Abyaneh, H., Molavi, O., Lai, R., & Lavasanifar, A. (2014).
 Mitochondrial delivery of doxorubicin via triphenylphosphine modification for overcoming drug resistance in MDA-MB-435/DOX cells. *Molecular Pharmaceutics*, *11*(8), 2640–9.
- Hardman, W. E., Avula, C. P. R., Fernandes, G., & Cameron, I. L. (2001). Three Percent Dietary Fish Oil Concentrate Increased Efficacy of Doxorubicin Against MDA-MB 231 Breast Cancer Xenografts, *Clinical Cancer Research*, 7(7), 2041–49.
- Harper, M.-E. (2002). Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *The FASEB Journal*, *16*(12), 1550–57.
- He, G., He, G., Zhou, R., Pi, Z., Zhu, T., Jiang, L., & Xie, Y. (2016). Enhancement of cisplatininduced colon cancer cells apoptosis by shikonin, a natural inducer of ROS in vitro and in vivo.
- He, X., Zhou, A., Lu, H., Chen, Y., Huang, G., Yue, X., & Wu, Y. (2013). Suppression of Mitochondrial Complex I Influences Cell Metastatic Properties. *PLoS ONE*, 8(4), 4–10.
- Herrmann, J. M., & Riemer, J. (2010). The intermembrane space of mitochondria. *Antioxidants* & *Redox Signaling*, 13(9), 1341-58.

- Hsu, P., Shi, Y., Joe, R., & Lozano, T. (2016). Regulation of Autophagy by Mitochondrial Phospholipids in Health and Diseases. *Biochimica & Biophysica Acta -Molecular and Cell Biology of Lipids*, (16).
- Huigsloot, M., Tijdens, I. B., Mulder, G. J., & Van De Water, B. (2002). Differential Regulation of Doxorubicin-induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis by Bcl-2 in Mammary Adenocarcinoma (MTLn3) Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 35869-79.
- Hurst, S., Hoek, J., & Sheu, S.-S. (2016). Mitochondrial Ca2+ and regulation of the permeability transition pore. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, *1*, 1–21.
- Hwang, I. T., Chung, Y. M., Kim, J. J., Chung, J. S., Kim, B. S., Kim, H. J., & Yoo, Y. Do. (2007). Drug resistance to 5-FU linked to reactive oxygen species modulator 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359(2), 304-10.
- Indran, I. R., Tufo, G., Pervaiz, S., & Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica & Biophysica Acta -Bioenergetics*, 1807(6), 735–45.
- Ishida, M., Sunamura, M., Furukawa, T., Akada, M., Fujimura, H., Shibuya, E., & Horii, A. (2007). Elucidation of the relationship of BNIP3 expression to gemcitabine chemosensitivity and prognosis. *World Journal of Gastroenterology*, 13(34), 4593–7.
- Jahnke, V. E., Sabido, O., Defour, A., Castells, J., Lefai, E., Roussel, D., & Freyssenet, D. (2010). Evidence for mitochondrial respiratory deficiency in rat rhabdomyosarcoma cells. *PLoS ONE*, 5(1).
- Jain, D. (2000). Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives. *Journal of Nuclear Cardiology : Official Publication of the American Society of Nuclear Cardiology*, 7(1), 53–62.
- Jiang, F., Ryan, M. T., Schlame, M., Zhao, M., Gu, Z., Klingenberg, M., ... Greenberg, M. L. (2000). Absence of Cardiolipin in the crd1 Null Mutant Results in Decreased Mitochondrial Membrane Potential and Reduced Mitochondrial Function. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 22387–94.
- Jones, P. M., & George, A. M. (2014). A reciprocating twin-channel model for ABC transporters. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 47(3), 189-220.

- Julienne, C. M., Tardieu, M., Chevalier, S., Pinault, M., Bougnoux, P., Labarthe, F., Couet, C., Servais, S., & Dumas, J.-F. (2014). Cardiolipin content is involved in liver mitochondrial energy wasting associated with cancer-induced cachexia without the involvement of adenine nucleotide translocase. *Biochimica & Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(5), 726–33.
- Jung, K., & Reszka, R. (2001). Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49(1-2), 87–105.
- Jungsuwadee, P., Nithipongvanitch, R., Chen, Y., Oberley, T. D., Butterfield, D. A., Clair, D. K. S., & Vore, M. (2009). Mrp1 Localization and Function in Cardiac Mitochondria after Doxorubicin. *Molecular Pharmacology*, 75(5), 1117-26.
- Kadenbach, B. (2003). Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. Biochimica & Biophysica Acta - Bioenergetics, 1604(2), 77–94.
- Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., Amoscato, A. A., & Borisenko, G. G. (2005). Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nature Chemical Biology*, 1(4), 223–32.
- Karnati, S., Lüers, G., Pfreimer, S., & Baumgart-Vogt, E. (2013). Mammalian SOD2 is exclusively located in mitochondria and not present in peroxisomes. *Histochemistry and Cell Biology*, 140(2), 105–17.
- Kathawala, R. J., Gupta, P., Ashby, C. R., & Chen, Z.-S. (2015). The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resistance Updates*, 18, 1–17.
- Khankari, N. K., Bradshaw, P. T., Steck, S. E., He, K., Olshan, A. F., Shen, J., & Gammon, M. D. (2015). Polyunsaturated fatty acid interactions and breast cancer incidence: A population-based case-control study on Long Island, New York. *Annals of Epidemiology*, 25(12), 929–35.
- Kiebish, M. A., Han, X., Cheng, H., Chuang, J. H., & Seyfried, T. N. (2008). Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *Journal of Lipid Research*, 49(12), 2545–56.
- Kiebish, M. A., Han, X., Cheng, H., Chuang, J. H., Seyfried, T. N. (2008). Brain mitochondrial lipid abnormalities in mice susceptible to spontaneous gliomas. *Lipids*, 43(10), 951-9.

- Kluza, J., Jendoubi, M., Ballot, C., Dammak, A., Jonneaux, A., Idziorek, T., & Marchetti, P. (2011). Exploiting mitochondrial dysfunction for effective elimination of imatinibresistant leukemic cells. *PLoS ONE*, 6(7), 1–14.
- Kobuchi, H., Moriya, K., Ogino, T., Fujita, H., Inoue, K., Shuin, T., & Utsumi, T. (2012).
 Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation. *PloS One*, 7(11), e50082.
- Koopman, W. J., Nijtmans, L. G., Dieteren, C. E., Roestenberg, P., Valsecchi, F., Smeitink, J. A., & Willems, P.H. (2010). Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(12), 1431-70.
- Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., & Vercesi, A. E. (2009).
 Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(4), 333–43.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99-163.
- Kubli, D. A., & Gustafsson, Å. B. (2012). Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circulation Research*, 111(9), 1208–21.
- Kumar, A. P., Loo, S. Y., Shin, S. W., Tan, T. Z., Eng, C. B., Singh, R., & Clement, M. V. (2014). Manganese Superoxide Dismutase Is a Promising Target for Enhancing Chemosensitivity of Basal-Like Breast Carcinoma. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(15), 2326–46.
- Kuninaka, S., Ichinose, Y., Koja, K., & Toh, Y. (2000). Suppression of manganese superoxide dismutase augments sensitivity to radiation, hyperthermia and doxorubicin in colon cancer cell lines by inducing apoptosis. *British Journal of Cancer*, 83(7), 928–34.
- Kussmaul, L., & Hirst, J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(20), 7607–12.
- Lambert, A. J., & Brand, M. D. (2009). Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods in Molecular Biology* (554), 165-81.
- Lebrecht, D., Setzer, B., Ketelsen, U. P., Haberstroh, J., & Walker, U. A. (2003). Time-Dependent and Tissue-Specific Accumulation of mtDNA and Respiratory Chain Defects in Chronic Doxorubicin Cardiomyopathy. *Circulation*, 108(19), 2423–29.

LeCoq, J., & Ballou, C. E. (1964). On the structure of cardiolipin. Biochemistry, 3, 976-80.

- Leman, G., Gueguen, N., Desquiret-Dumas, V., Kane, M. S., Wettervald, C., Chupin, S., & Procaccio, V. (2015). Assembly defects induce oxidative stress in inherited mitochondrial complex I deficiency. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 65, 91– 103.
- Lenaz, G., & Genova, M. L. (2010). Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(8), 961–1008.
- Li, L., & Yu, A. Q. (2015). The functional role of peroxiredoxin 3 in reactive oxygen species, apoptosis, and chemoresistance of cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(12), 2071–77.
- Li, W., Zhang, H., Assaraf, Y. G., Zhao, K., Xu, X., Xie, J., & Chen, Z.-S. (2016). Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resistance Updates*, 27, 14–29.
- Li, Y. C., Fung, K. P., Kwok, T. T., Lee, C. Y., Suen, Y. K., & Kong, S. K. (2004). Mitochondria-targeting drug oligomycin blocked P-glycoprotein activity and triggered apoptosis in doxorubicin-resistant HepG2 cells. *Chemotherapy*, 50(2), 55–62.
- Linton, K. J., & Higgins, C. F. (2007). Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflügers Archiv*, 453(5), 555-67.
- Liu, J., & Ma, D. W. L. (2014). The Role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in the Prevention and Treatment of Breast Cancer. *Nutrients*, *6*(11), 5184–223.
- Liu, J. R., Opipari, A. W., Tan, L., Jiang, Y., Zhang, Y., Tang, H., & Nuñez, G. (2002). Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: Implications for chemoresistance. *Cancer Research*, 62(3), 924–31.
- Lorenzina Fiallo, M. M., & Garnier-Suillerot, A. (1986). Interaction of adriamycin with cardiolipin-containing vesicles. Evidence of an embedded site for the dihydroanthraquinone moiety. *Biochimica & Biophysica Acta Biomembranes*, 854(1), 143–46.
- Ma, B. J., Taylor, W. A., Dolinsky, V. W., & Hatch, G. M. (1999). Acylation of monolysocardiolipin in rat heart. *Journal of Lipid Research*, 40(10), 1837–45.
- Ma, J., Zhao, Z., Wu, K., Xu, Z., & Liu, K. (2016). MCL-1 is the key target of adjuvant chemotherapy to reverse the cisplatin-resistance in NSCLC. *Gene*, *587*(2), 147–54.

- Mahéo, K., Vibet, S., Steghens, J. P., Dartigeas, C., Lehman, M., Bougnoux, P., & Goré, J. (2005). Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: A role for lipoperoxidation. *Free Radical Biology & Medicine*, 39(6), 742–51.
- Mailloux, R. J., Nii-Klu Adjeitey, C., Harper, M.-E., & Moran, M. (2010). Genipin-Induced Inhibition of Uncoupling Protein-2 Sensitizes Drug-Resistant Cancer Cells to Cytotoxic Agents. *PLoS ONE*, 5(10).
- Malhi, S. S., Budhiraja, A., Arora, S., Chaudhari, K. R., Nepali, K., Kumar, R., ... Murthy, R. S. R. (2012). Intracellular delivery of redox cycler-doxorubicin to the mitochondria of cancer cell by folate receptor targeted mitocancerotropic liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 432(1-2), 63–74.
- Mallick, A., More, P., Ghosh, S., Chippalkatti, R., Chopade, B. A., Lahiri, M., & Basu, S. (2015). Dual drug conjugated nanoparticle for simultaneous targeting of mitochondria and nucleus in cancer cells. ACS Applied Materials and Interfaces, 7(14), 7584-98.
- Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G., & Genova, M. L. (2013). Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. Antioxidants & Redox Signaling, 19(13), 1469–80.
- McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D. R., & Ryan, M. T. (2006). Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes Are Destabilized in Barth Syndrome Patients. *Journal of Molecular Biology*, 361(3), 462–69.
- Mehrgou, A., & Akouchekian, M. (2016). The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*. 1-12
- Mejia, E. M., Ibdah, J. A., Sparagna, G. C., & Hatch, G. M. (2015). Differential reduction in cardiac and liver monolysocardiolipin acyltransferase-1 and reduction in cardiac and liver tetralinoleoyl-cardiolipin in the α-subunit of trifunctional protein heterozygous knockout mice. *Biochemical Journal*, 471, 123–29.
- Meredith, A. M., & Dass, C. R. (2016). Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(6), 729– 41.
- Michels, J., Obrist, F., Vitale, I., Lissa, D., Garcia, P., Behnam-Motlagh, P., & Kroemer, G. (2014). MCL-1 dependency of cisplatin-resistant cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 92(1), 55–61.

- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, *56*(2), 185–229.
- Mirski, S. E., Gerlach, J. H., & Cole, S. P. (1987). Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Research*, *47*(10), 2594–98.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*, *191*, 144–48.
- Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M., & Kawanishi, S. (2005). Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sciences*, *76*(13), 1439–53.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., & Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS Journal*, 274(6), 1393–418.
- Mouradian, M., Kikawa, K. D., Dranka, B. P., Komas, S. M., Kalyanaraman, B., & Pardini, R.
 S. (2015). Docosahexaenoic acid attenuates breast cancer cell metabolism and the Warburg phenotype by targeting bioenergetic function. *Molecular Carcinogenesis*, 54(9), 810–20.
- Muller, F. L., Liu, Y., & Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49064–49073.
- Munteanu, E., Verdier, M., Grandjean-Forestier, F., Stenger, C., Jayat-Vignoles, C., Huet, S., & Ratinaud, M. H. (2006). Mitochondrial localization and activity of P-glycoprotein in doxorubicin-resistant K562 cells. *Biochemical Pharmacology*, *71*(8), 1162–74.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, *417*(1), 1–13.
- Murphy, R. A., Mourtzakis, M., Chu, Q. S., Baracos, V. E., Reiman, T., & Mazurak, V. C. (2011). Supplementation with fish oil increases first-line chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 117(16), 3774-80.
- Myers, C. E., McGuire, W. P., Liss, R. H., Ifrim, I., Grotzinger, K., & Young, R. C. (1977). The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, 197(4299), 165–67.
- Nedergaard, J., & Cannon, B. (2014). The "novel" "uncoupling" proteins UCP2 and UCP3 : what do they really do? Pros and cons for suggested functions. *Experimental Physiology*, 88(1), 65–84.

- Negre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Troly, M., Salvayre, R., Penicaud, L., & Casteilla, L. (1997). A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *The FASEB Journal*, 11(10), 809–15.
- Nogueira, V., Walter, L., Avéret, N., Fontaine, E., Rigoulet, M., & Leverve, X. M. (2002). Thyroid status is a key regulator of both flux and efficiency of oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, *34*(1), 55–66.
- Octavia, Y., Tocchetti, C. G., Gabrielson, K. L., Janssens, S., Crijns, H. J., & Moens, A. L. (2012). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(6), 1213–25.
- Okado-Matsumoto, A., & Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. Cu,Zn-SOD in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38388–93.
- Oliva, C. R., Moellering, D. R., Gillespie, G. Y., & Griguer, C. E. (2011). Acquisition of chemoresistance in gliomas is associated with increased mitochondrial coupling and decreased ROS production. *PLoS ONE*, *6*(9), 9–13.
- Oliva, C. R., Nozell, S. E., Diers, A., McClugage, S. G., Sarkaria, J. N., Markert, J. M., & Griguer, C. E. (2010). Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 39759–67.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, *12*(5), 913–22.
- Palade, G. E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1(22), 188–211.
- Palorini, R., Simonetto, T., Cirulli, C., & Chiaradonna, F. (2013). Mitochondrial complex I inhibitors and forced oxidative phosphorylation synergize in inducing cancer cell death. *International Journal of Cell Biology*, 2013.
- Pan, B., Chen, Y., Song, H., Xu, Y., Wang, R., & Chen, L. (2014). Mir-24-3p downregulation contributes to VP16–DDP resistance in small-cell lung cancer by targeting ATG4A. *Oncotarget*, 6(1), 317-31.
- Pangborn, M. C. (1942). Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart. *The Journal of Biological Chemistry*, 143, 247-56.

- Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F. M., & Petrosillo, G. (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica & Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(4), 408–17.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V., & Ruggiero, F. M. (2009). Role of cardiolipin peroxidation and Ca2+ in mitochondrial dysfunction and disease. *Cell Calcium*, 45(6), 643–50.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A., & Ruggiero, F. M. (2004). Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Reperfused Rat Heart: Involvement of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin. *Circulation Research*, 94(1), 53–59.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., & Ruggiero, F. M. (2002). Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene*, 286(1), 135–41.
- Paradies, G., Ruggiero, F. M., & Dinoi, P. (1991). The influence of hypothyroidism on the transport of phosphate and on the lipid composition in rat-liver mitochondria. *Biochimica* & *Biophysica Acta - Biomembranes*, 1070(1), 180–86.
- Park, H. G., Lawrence, P., Engel, M. G., Kothapalli, K., & Brenna, J. T. (2016). Metabolic fate of docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) in human cells: direct retroconversion of DHA to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) dominates over elongation to tetracosahexaenoic acid (24:6n-3). *FEBS Letters*, 590(18), 3188–94.
- Parker, M. A., King, V., & Howard, K. P. (2001). Nuclear magnetic resonance study of doxorubicin binding to cardiolipin containing magnetically oriented phospholipid bilayers. *Biochimica & Biophysica Acta - Biomembranes*, 1514(2), 206–16.
- Paterson, J. K., & Gottesman, M. M. (2007). P-Glycoprotein is not present in mitochondrial membranes. *Experimental Cell Research*, 313(14), 3100-5.
- Patrushev, M. V. (2010). Mitochondrial fission and fusion. *Essays in Biochemistry*, 47(11), 85–98.
- Petrosillo, G., Casanova, G., Matera, M., Ruggiero, F. M., & Paradies, G. (2006). Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: Induction of permeability transition and cytochrome c release. *FEBS Letters*, 580(27), 6311–16.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F. M., Di Venosa, N., & Paradies, G. (2003). Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *The FASEB Journal*, 17(6), 714–16.

- Peyta, L., Jarnouen, K., Pinault, M., Guimaraes, C., Pais De Barros, J. P., Chevalier, S., Dumas, J-F., & Servais, S. (2016). Reduced cardiolipin content decreases respiratory chain capacities and increases ATP synthesis yield in the human HepaRG cells. *Biochimica & Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(4), 443–53.
- Pons, D. G., Nadal-Serrano, M., Torrens-Mas, M., Valle, A., Oliver, J., & Roca, P. (2015). UCP2 inhibition sensitizes breast cancer cells to therapeutic agents by increasing oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 86, 67–77.
- Porcelli, A. M., Ghelli, A., Zanna, C., Pinton, P., Rizzuto, R., & Rugolo, M. (2005). pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 326(4), 799–804.
- Praet, M., & Ruysschaert, J.-M. (1993). In-vivo and in-vitro mitochondrial membrane damages induced in mice by adriamycin and derivatives. *Biochimica & Biophysica Acta*, 1149, 79– 85.
- Rasola, A., & Bernardi, P. (2014). THe mitochondrial permeability transition pore and its adaptive responses in tumor cells. *Cell Calcium*, *56*(6), 437-45.
- Rehling, P., Wiedemann, N., Pfanner, N., & Truscott, K. N. (2001). The mitochondrial import machinery for preproteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36(3), 291–336.
- Renault, T. T., & Chipuk, J. E. (2014). Death upon a kiss: Mitochondrial outer membrane composition and organelle communication govern sensitivity to BAK/BAX-dependent apoptosis. *Chemistry and Biology*, 21(1), 114–23.
- Robinson, N. C. (1982). Specificity and binding affinity of phospholipids to the high-affinity cardiolipin sites of beef heart cytochrome c oxidase. *Biochemistry*, *21*(1), 184–88.
- Rocha, V. C. J., França, L. S. D. A., De Araújo, C. F., Ng, A. M., De Andrade, C. M., Andrade,
 A. C., & Pontes-De-Carvalho, L. C. (2016). Protective effects of mito-TEMPO against doxorubicin cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(3), 659-62.
- Roh, J.-L., Park, J. Y., Kim, E. H., Jang, H. J., & Kwon, M. (2015). Activation of mitochondrial oxidation by PDK2 inhibition reverses cisplatin resistance in head and neck cancer, *Cancer Letters*, 371(1), 20–29.
- Rohrbach, S. (2009). Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondria. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(2), 4103–116.

- Roundhill, E. A., & Burchill, S. A. (2012). Detection and characterisation of multi-drug resistance protein 1 (MRP-1) in human mitochondria. *British Journal of Cancer*, *106*(6), 1224–33.
- Schägger, H., & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, *19*(8), 1777–83.
- Schlame, M., Brody, S., & Hostetler, K. Y. (1993). Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes. Comparison of biosynthetic reactions and molecular acyl species. *European Journal of Biochemistry*, 212(3), 727–33.
- Schlame, M., & Greenberg, M. L. (2016). Biosynthesis, remodeling and turnover of mitochondrial cardiolipin. *Biochimica & Biophysica Acta*, (16).
- Schlame, M., Rua, D., & Greenberg, M. L. (2000). The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in Lipid Research*, 39(3), 257–88.
- Schlame, M., & Rüstow, B. (1990). Lysocardiolipin formation and reacylation in isolated rat liver mitochondria. *The Biochemical Journal*, 272(3), 589–95.
- Schneider, V., Krieger, M. L., Bendas, G., Jaehde, U., & Kalayda, G. V. (2013). Contribution of intracellular ATP to cisplatin resistance of tumor cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18(2), 165–74.
- Schneider ', E., Yamazaki2, H., Sinha2, B., & Cowan, K. (1995). Buthionine sulphoximinemediated sensitisation of etoposide-resistant human breast cancer MCF7 cells overexpressing the multidrug resistance-associated protein involves increased drug accumulation. *British Journal of Cancer*, 71(4), 738–43.
- Schwall, C. T., Greenwood, V. L., & Alder, N. N. (2012). The stability and activity of respiratory Complex II is cardiolipin-dependent. *Biochimica & Biophysica Acta -Bioenergetics*, 1817(9), 1588–96.
- Sczaniecka, A. K., Brasky, T. M., Lampe, J. W., Patterson, R. E., & White, E. (2012). Dietary intake of specific fatty acids and breast cancer risk among postmenopausal women in the VITAL cohort. *Nutrition and Cancer*, 64(8), 1131-42.
- Sedlák, E., & Robinson, N. C. (1999). Phospholipase A 2 Digestion of Cardiolipin Bound to Bovine Cytochrome c Oxidase Alters Both Activity and Quaternary Structure. *Biochemistry*, 38(45), 14966-72.
- Sharma, L. K., Fang, H., Liu, J., Vartak, R., Deng, J., & Bai, Y. (2011). Mitochondrial respiratory complex I dysfunction promotes tumorigenesis through ROS alteration and AKT activation. *Human Molecular Genetics*, 20(23), 4605–16.

- Sharma, L. K., Lu, J., & Bai, Y. (2009). Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Current Medicinal Chemistry*, *16*(10), 1266–77.
- Sharom, F. J. (2011). The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays in Biochemistry*, 50(1), 161–78.
- Sharpley, M. S., Shannon, R. J., Draghi, F., & Hirst, J. (2006). Interactions between Phospholipids and NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) from Bovine Mitochondria. *Biochemistry*, 45(1), 241-48.
- Shen, Y.-C., Ou, D.-L., Hsu, C., Lin, K.-L., Chang, C.-Y., Lin, C.-Y., & Cheng, A.-L. (2013). Activating oxidative phosphorylation by a pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor overcomes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*, 108(1), 72–81.
- Shin, Y.-K., Yoo, B. C., Chang, H. J., Jeon, E., Hong, S.-H., Jung, M.-S., & Park, J.-G. (2005). Down-regulation of Mitochondrial F 1 F 0 -ATP Synthase in Human Colon Cancer Cells with Induced 5-Fluorouracil Resistance. *Cancer Research*, 65(8), 3162–70.
- Simonin, K., Brotin, E., Dufort, S., Dutoit, S., Goux, D., N'diaye, M., & Poulain, L. (2009). Mcl-1 is an important determinant of the apoptotic response to the BH3-mimetic molecule HA14-1 in cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(11), 3162–70.
- Sjöstrand, F. S. (1953). Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature*, *171*(4340), 30–2.
- Soengas, M. S., Capodieci, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., & Lowe, S.
 W. (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 409(6817), 207–11.
- Solazzo, M., Fantappiè, O., D'Amico, M., Sassoli, C., Tani, A., Cipriani, G., & Mazzanti, R. (2009). Mitochondrial expression and functional activity of breast cancer resistance protein in different multiple drug-resistant cell lines. *Cancer Research*, 69(18), 7235–42.
- Solazzo, M., Fantappiè, O., Lasagna, N., Sassoli, C., Nosi, D., & Mazzanti, R. (2006). P-gp localization in mitochondria and its functional characterization in multiple drug-resistant cell lines. *Experimental Cell Research*, 312(20), 4070-8.
- Solem, L. E., Henry, T. R., & Wallace, K. B. (1994). Disruption of Mitochondrial Calcium Homeostasis Following Chronic Doxorubicin Administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 129(2), 214–22.

- Song, Y.-F., Liu, D.-Z., Cheng, Y., Liu, M., Ye, W.-L., Zhang, B.-L., & Zhou, S.-Y. (2015). Dual subcellular compartment delivery of doxorubicin to overcome drug resistant and enhance antitumor activity. *Scientific Reports*, (5).
- Souid, A.-K., Penefsky, H. S., Sadowitz, P. D., & Toms, B. (2005). Enhanced Cellular Respiration in Cells Exposed to Doxorubicin. *Molecular Pharmaceutics*, *3*(3), 307-21.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409-16.
- Sparagna, G. C., Chicco, A. J., Murphy, R. C., Bristow, M. R., Johnson, C. A., Rees, M. L., Moore, R. L. (2007). Loss of cardiac tetralinoleoyl cardiolipin in human and experimental heart failure. *The Journal of Lipid Research*, 48(7), 1559–70.
- Stanley, W. C., Khairallah, R. J., & Dabkowski, E. R. (2012). Update on lipids and mitochondrial function: impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Current Opinion* in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 15(2), 122-26.
- Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., & Pan, H. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death & Disease*, 4, e838.
- Sullivan, L. B., & Chandel, N. S. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer & Metabolism*, 2(1), 17.
- Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(9), 621–32.
- Tao, Z., Withers, H. G., Penefsky, H. S., Goodisman, J., & Souid, A.-K. (2006). Inhibition of Cellular Respiration by Doxorubicin. *Chemical Research in Toxicology*, 19(8), 1051-8.
- Taylor, W. A., & Hatch, G. M. (2003). Purification and Characterization of Monolysocardiolipin Acyltransferase from Pig Liver Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 12716–21.
- Taylor, W. A., Mejia, E. M., Mitchell, R. W., Choy, P. C., Sparagna, G. C., & Hatch, G. M. (2012). Human trifunctional protein alpha links cardiolipin remodeling to beta-oxidation. *PloS One*, 7(11), e48628.
- Thayer, W. (1977). Adriamycin stimulated superoxide formation in submitochondrial particles. *Chemico-Biological Interactions*, 19(3), 265-78.

- Todor, I. N., Lukyanova, N. Y., & Chekhun, V. F. (2012). The lipid content of cisplatin- and doxorubicin- resistant MCF-7 human breast cancer cells. *Experimental Oncology*, 34(2), 97–100.
- Torrens-Mas, M., Pons, D. G., Sastre-Serra, J., Oliver, J., & Roca, P. (2016). SIRT3 Silencing Sensitizes Breast Cancer Cells to Cytotoxic Treatments through an Increment in ROS Production. *Journal of Cellular Biochemistry*.
- Tsanou, E., Ioachim, E., Briasoulis, E., Damala, K., Charchanti, A., Karavasilis, V., & Agnantis, N. J. (2004). Immunohistochemical expression of superoxide dismutase (MnSOD) anti-oxidant enzyme in invasive breast carcinoma. *Histology and Histopathology*, 19(3), 807–13.
- Varin, E., Denoyelle, C., Brotin, E., Meryet-Figuière, M., Giffard, F., Abeilard, E., & Poulain,
 L. (2010). Downregulation of Bcl-xL and Mcl-1 is sufficient to induce cell death in mesothelioma cells highly refractory to conventional chemotherapy. *Carcinogenesis*, 31(6), 984–93.
- Vergeade, A., Bertram, C. C., Bikineyeva, A. T., Zackert, W. E., Zinkel, S. S., May, J. M., & Boutaud, O. (2016). Cardiolipin fatty acid remodeling regulates mitochondrial function by modifying the electron entry point in the respiratory chain. *Mitochondrion*, 28, 88–95.
- Vibet, S., Goupille, C., Bougnoux, P., Steghens, J. P., Goré, J., & Mahéo, K. (2008). Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. *Free Radical Biology & Medicine*, 44(7), 1483–91.
- Vreken, P., Valianpour, F., Nijtmans, L. G., Grivell, L. A., Plecko, B., Wanders, R. J. A., & Barth, P. G. (2000). Defective Remodeling of Cardiolipin and Phosphatidylglycerol in Barth Syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(2), 378– 82.
- Wannous, R., Bon, E., Mahéo, K., Goupille, C., Chamouton, J., Bougnoux, P., & Chevalier, S. (2013). PPARβ mRNA expression, reduced by n-3 PUFA diet in mammary tumor, controls breast cancer cell growth. *Biochimica & Biophysica Acta*, *1831*(11), 1618–25.
- Warburg, O. (1956a). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, *124*(3215), 269–70.Warburg, O. (1956b). On the origin of cancer cells. *Science*, *123*(3191), 309–14.
- Watkins, S. M., Carter, L. C., & German, J. B. (1998). Docosahexaenoic acid accumulates in cardiolipin and enhances HT-29 cell oxidant production. *Journal of Lipid Research*, 39(8), 1583–8.
- Wilkinson, S. T., Tome, M. E., & Briehl, M. M. (2012). Mitochondrial Adaptations to Oxidative Stress Confer Resistance to Apoptosis in Lymphoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 10212–28.
- Wintzell, M., Löfstedt, L., Johansson, J., Pedersen, A. B., Fuxe, J., & Shoshan, M. (2012). Repeated cisplatin treatment can lead to a multiresistant tumor cell population with stem cell features and sensitivity to 3-bromopyruvate. *Cancer Biology and Therapy*, 13(14), 1454-62.
- Wojtczak, L., & Więckowski, M. R. (1999). The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, 31(5), 447–55.
- Xu, R.-H., Pelicano, H., Zhou, Y., Carew, J. S., Feng, L., Bhalla, K. N., & Huang, P. (2005). Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells: A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia. *Cancer Research*, 65(2), 613–21.
- Xu, Y., Zhou, L., Huang, J., Liu, F., Yu, J., Zhan, Q., & Zhao, X. (2011). Role of Smac in determining the chemotherapeutic response of esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 17(16), 5412–22.
- Yen, H.-C., Oberley, T. D., Vichitbandha, S., Ho, Y.-S., & Clair, D. K. S. (1996). Mn Superoxide Dismutase and Adriamycin-induced Cardiac Toxicity The Protective Role of Manganese Superoxide Dismutase Against Adriamycin-induced Acute Cardiac Toxicity in Transgenic Mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(5), 1253–60.
- Zacal, N., Espiritu, M., Singh, G., & Rainbow, A. J. (2005). Increased BNIP3 and decreased mutant p53 in cisplatin-sensitive PDT-resistant HT29 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(2), 648-57.
- Zhang, J., Cui, X., Yan, Y., Li, M., Yang, Y., Wang, J., & Zhang, J. (2016). Research progress of cardioprotective agents for prevention of anthracycline cardiotoxicity. *American Journal of Translational Research*, 8(7), 2862–75.
- Zhang, J., Guan, Z., Murphy, A. N., Wiley, S. E., Perkins, G. A., Worby, C. A. & Dixon, J. E. (2011). Mitochondrial phosphatase PTPMT1 is essential for cardiolipin biosynthesis. *Cell Metabolism*, 13(6), 690–700.
- Zhang, L., Ren, X., Cheng, Y., Huber-Keener, K., Liu, X., Zhang, Y., & Yang, J.-M. (2013). Identification of Sirtuin 3, a mitochondrial protein deacetylase, as a new contributor to tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 86(6), 726-33.

- Zheng, J.-S., Student, P., Hu, X.-J., Zhao Masters Student 1, Y.-M., Yang, J., & Li Professor,
 D. (2013). Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. *Bristish Medical Journal*.
- Zhou, Y., Rucker, E. B., & Zhou, B. P. (2015). Autophagy regulation in the development and treatment of breast cancer. *Biochimica & Biophysica Acta*, 48(1), 60-74.
- Zhou, Y., Tozzi, F., Chen, J., Fan, F., Xia, L., Wang, J., & Weihua, Z. (2012). Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells. *Cancer Research*, 72(1), 304–14.
- Zou, X., Liang, J., Sun, J., Hu, X., Lei, L., Wu, D., & Liu, L. (2016). Allicin sensitizes hepatocellular cancer cells to anti-tumor activity of 5-fluorouracil through ROS-mediated mitochondrial pathway. *Journal of Pharmacological Sciences*, 131(4), 233-40.
- Zu, X. L., & Guppy, M. (2004). Cancer metabolism: Facts, fantasy, and fiction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *313*(3), 459–65.

Annexes

Annexe 1 : Produits utilisés pour l'étude de la bioénergétique mitochondriale

Produits	Fournisseur	Concentration Stock	Solvant	Concentration utilisée
Glutamate	Sigma	0,5M	Eau distillée	5 mM
Malate	Sigma	0,5M	Eau distillée	5 mM
Pyruvate	Sigma	0,5M	Eau distillée	5 mM
Succinate	Sigma	0,5M	Eau distillée	10 mM
TMPD	Sigma	100 mM	Eau distillée	400 µM
Ascorbate	Sigma	400 mM	Eau distillée	5 mM
ADP	Sigma	75 mM	Eau distillée	1,5 mM
NAD ⁺	Sigma	5 mM	Eau distillée	0,5 mM
lodoacétate	Sigma	200 mM	Eau distillée	2 mM
oligomycine	Sigma	0,8 mM	Ethanol 70%	5,25 µg/mL
FCCP	Sigma	80 µM	Ethanol 70%	titration
Antimycine A	Sigma	2mM	Ethanol 70%	2 µM
Digitonine	Sigma	1 mg/mL	Eau distillée4	Selon la lignée étudiée

Remarque : l'oligomycine, le FCCP et l'antimycine A sont repris dans de l'éthanol 70%. La titration du FCCP est effectuée par l'ajout successif de 2 μ L d'une solution à 80 μ M jusqu'à la stimulation maximale de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Le TMPD, l'ADP, le NAD⁺, l'iodoacétate, le cytochome c et la digitonine sont préparés de manière extemporanée.

Annexe 2 : Publications et communications

• <u>Publication intégrée à la thèse</u> :

Julie Dartier, Elsa Lemaitre, Igor Chourpa, Caroline Goupille, Stéphane Servais, Stéphan Chevalier, Karine Mahéo and Jean-François Dumas. (2016) ATP-dependent activity and mitochondrial localization of drug efflux pumps in doxorubicin-resistant breast cancer cells". *BBA General Subjects*, en révision

• <u>Publication en préparation</u> :

Julie Dartier, Elsa Lemaitre, Valérie Desquiret-Dumas, Naig Gueguen, Michelle Pinault, Cyrille Guimaraes, Hélène Blasco, Stéphan Chevalier, Stéphane Servais, Steven Claypool, Grant Hatch, Karine Mahéo and Jean-François Dumas. A role for mitochondrial respiratory chain complex 1 and cardiolipin metabolism in doxorubicin resistance in breast cancer cells.

• <u>Communications orales</u> :

9ème Colloque de Axe « Valorisation des produits de la mer en cancérologie » Cancéropôle Grand Ouest, La Rochelle, France. « Rôle du métabolisme énergétique mitochondrial dans la chimiosensibilisation des cellules cancéreuses mammaires: interactions avec les AGPI n-3 » – (13-14/06/2013)

10ème Colloque de l'Axe « Valorisation des produits de la mer en cancérologie » Cancéropôle Grand Ouest, Richelieu, France. « Rôle du métabolisme mitochondrial dans la chimiosensibilité des cellules cancéreuses mammaires : interactions avec les AGPI n-3 » - (15-16/05/2014)

27ème Colloque Biotechnocentre, Seillac, France. « Métabolisme énergétique mitochondrial et sensibilité des cellules cancéreuses mammaires aux anthracyclines » - (09/10/2014)

11ème Colloque de l'Axe « Valorisation des produits de la mer en cancérologie » du Cancéropôle Grand Ouest, Brest, France. « Métabolisme énergétique mitochondrial et sensibilité des cellules cancéreuses mammaires aux anthracyclines » - (21/05/2015) Réseau NACRe, Paris, France. « Les mitochondries des cellules cancéreuses résistantes: étude du lien entre le métabolisme énergétique et l'accumulation de la doxorubicine » – (16/10/2015)

12ème Colloque de l'Axe « Valorisation des produits de la mer en cancérologie » du Cancéropôle Grand Ouest, Nantes, France. « Rôle du métabolisme énergétique mitochondrial dans la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires à la doxorubicine » – (30/05/2016)

• Communications affichées dans des congrès internationaux :

17ème Congrès du Groupe Français de Bioénergétique, Carry-le-Rouet, France. « Mitochondrial energy metabolism in breast cancer cells chemoresistance : effects of n-3 PUFAs » – (25-29/09/2013)

1st Metabolism & cancer symposium, cancéropôle PACA, Nice, France. « Study of mitochondrial energy metabolism in the sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin and their chemosensitization by n-3 polyunsaturated fatty acids » - (25-26/09/2014)

lère Journée de la Recherche Tours-Poitiers-Limoges, Tours, France. « Etude du métabolisme énergétique mitochondrial dans la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires aux anthracyclines et leur chimiosensibilisation par les acides gras polyinsatures n-3 » - (05/12/2016)

EACR AACR SIC Special Conference on Anticancer Drug Action and Drug Resistance: From Cancer Biology to the Clinic, Florence, Italie. « Study of mitochondrial energy metabolism in the sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin » – (20-23/06/2015)

3st Metabolism & cancer symposium, cancéropôle PACA, Pallavas-les-Flots, France. « Doxorubicin resistance of breast cancer cells: involvement of mitochondrial complex I and cardiolipins ? » - (21-23/09/2014)

Participation au 5ème Atelier du réseau MeetOchondrie : « Voir la dynamqiue mitochondriale – Santé et Végétal » – Angers, France – (23-25/06/2014)



Julie DARTIER

Etude du métabolisme énergétique mitochondrial et des cardiolipines dans la résistance des cellules cancéreuses mammaires à la doxorubicine



Résumé

La résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie est une cause majeure de l'échec thérapeutique. Des études suggèrent qu'une adaptation du métabolisme énergétique pourrait jouer un rôle dans cette résistance. Ce travail de thèse montre que la résistance des cellules cancéreuses mammaires MCF-7dox à la doxorubicine est associée à une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et à un métabolisme des cardiolipines (CL) particulier (diminution de la quantité de CL et augmentation de la quantité de MLCL, la forme immature des CL). Nos résultats montrent aussi que les mitochondries des cellules MCF-7dox expriment deux pompes d'efflux ATP-dépendantes (BCRP et MRP1) qui participent à limiter la quantité de doxorubicine accumulée dans ces mitochondries. De plus, l'activité de ces deux transporteurs dépend partiellement de l'ATP mitochondrial dont l'efficacité de synthèse est améliorée dans les cellules MCF-7dox. D'autre part, nous montrons que l'effet sensibilisant du DHA à la doxorubicine dans les cellules MCF-7dox implique un stress oxydant mitochondrial et s'accompagne d'une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP.

Mots clés : Cardiolipines, DHA, Doxorubicine, Métabolisme énergétique mitochondrial, Pompes d'efflux ATPdépendante

Résumé en anglais

Resistance of cancer cells to chemotherapy is a major cause of treatment failure. Studies have suggested that an adaptation of energy metabolism may play a role in the development of this resistance. The present work shows that resistance of the breast cancer cell line MCF-7dox to doxorubicin is associated with decreased activity of the mitochondrial respiratory chain complex I and particularly altered cardiolipin (CL) metabolism, (decreased CL levels and increased MLCL levels, the immature form of the CL). Our results also show that mitochondria from MCF-7dox cells express two ATP-dependent efflux pumps (BCRP and MRP1) limiting the accumulation of doxorubicin in these mitochondria. In addition, the activity of these two transporters is partially dependent on mitochondrial ATP synthesis which efficiency is improved in MCF-7dox cells. Moreover, we show that the sensitizing effect of DHA to doxorubicin in MCF-7dox cells is regulated by mitochondrial oxidative stress and is accompanied by a decrease in ATP synthesis efficiency.

Keywords : Cardiolipins, DHA, Doxorubicin, Mitochondrial energy metabolism, ATP-binding cassette protein