

UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE :

Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV)

INSERM UMR 1069 « Nutrition Croissance et Cancer »

THÈSE présentée par :

Seyedeh Tayebbeh AHMAD POUR

soutenue le : **4 Novembre 2021**

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé/ Physiologie

Etude du rôle de la mitophagie et de la tafazzin dans la résistance des cellules cancéreuses du sein à la doxorubicine

THÈSE dirigée par :

M. DUMAS Jean-François

MCF - HDR, université de Tours

RAPPORTEURS :

M^{me} CARRIER Alice

DR, CRCM, université Aix-Marseille

M^{me} FEILLET-COUDRAY Christine

DR, INRAE, Montpellier

Président du jury :

M. VOURC'H Patrick

PU – PH, université de Tours

JURY :

M^{me} CARRIER Alice

DR, CRCM, université Aix-Marseille

M. DUMAS Jean-François

MCF - HDR, université de Tours

M^{me} FEILLET-COUDRAY Christine

DR, INRAE, Montpellier

M. MAILLET Laurent

CR, CRCINA, université de Nantes

M. SERVAIS Stéphane

PR, université de Tours

M. VOURC'H Patrick

PU - PH, université de Tours

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mesdames le Dr. Alice Carrier et le Dr. Christine Feillet-Coudray pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. J'adresse mes sincères remerciements aux Messieurs le Dr. Laurent Maillet, le Pr. Stéphane Servais et le Pr. Patrick Vourc'h d'avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail.

Je remercie chaleureusement le directeur du laboratoire N2C, Monsieur le Pr. Christophe Vandier et la directrice adjointe Madame le Pr. Gaëlle Fromont pour leur disponibilité et bienveillance.

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de thèse Monsieur le Dr. Jean-François Dumas de m'avoir fait confiance. Jean-François, je te remercie pour ta gentillesse et ton écoute qui m'ont permis de travailler dans une ambiance toujours calme malgré le stress de la thèse. Je te remercie également de m'avoir laissé la liberté de tester de nouvelles hypothèses.

Je remercie très sincèrement ma co-encadrant non-officielle Madame le Pr. Karine Mahéo pour ses conseils très constructifs et sa compétence scientifique.

Je tiens à remercier ensemble de l'équipe MitoLab de l'université d'Angers pour leur collaboration. Je remercie plus particulièrement, Madame le Dr. Valérie Désquirit-Dumas. Valérie je te remercie pour ta disponibilité, tes conseils très constructifs et les réponses très complètes que tu donnais toujours à mes questions.

Mes prochains remerciements vont à l'ensemble de l'équipe du N2C pour les années passé ensemble. Merci à vous tous d'avoir partagé vos expériences et vos connaissances scientifiques. Lucie, merci beaucoup pour tes conseils dans les manip mitophagie. Un grand merci à Isabelle pour ton aide dans les manip et Catherine pour les commandes. Sans vous deux le travail quotidien au laboratoire ne sera pas possible. Merci aux anciens thésards (les docteurs actuels !!) pour les bons moments que nous avons passés ensemble. Bon courage aux nouveaux thésards pour les années à venir. Une pensée spéciale aux filles de bureau 5. Adeline, merci pour la joie que tu as apportée à mes manip sur les mitochondries. Céline, merci de m'avoir appelé la reine de sagesse ! Chahrazed, tu es ma sœur même si tu es d'un autre madarshwaren, merci pour ta présence pendant les moments stressants. Sana, merci pour les bons moments qu'on a passés ensemble pendant la dernière année de thèse, pour les déjeuners du midi et les pauses-café. Je suis sûre que les pauses de café ne sera plus pareille pour moi (et pour toi non plus !).

Enfin, mes remerciements chaleureux et sincères vont à ma famille, surtout mon mari pour l'immense soutien et l'espoir qu'il m'a apporté. Sans cet espoir, cette thèse n'aurait pas été possible. Merci à toi pour la force que tu m'as donnée. Je t'aime !

Table des matières

Remerciements	3
Abstract	7
Résumé	8
Liste des abréviations	10
Liste des figures	14
Liste des tableaux	16
INTRODUCTION	17
Chapitre 1 ; Les mitochondries	18
1. Structure des mitochondries	18
2. Production d'ATP	21
3. Les espèces réactive de l'oxygène (ERO).....	25
4. Mitochondries et mort cellulaire	28
5. Dynamique des mitochondries	32
Chapitre 2 ; Cancer du sein et doxorubicine	38
1. Cancer du sein	38
2. La doxorubicine (DOX)	41
Chapitre 3 ; Les mitochondries et la chimiorésistance	46
1. La reprogrammation métabolique dans la chimiorésistance	46
2. Le rôle de la mitophagie dans la chimiorésistance	50
Chapitre 4 ; La Cardiolipine (CL) dans le cancer	53
1. Cardiolipin Metabolism	55
2. Role of CL in Metabolic Reprogramming	58
3. Role of CL in Mitochondrial Quality Control	60
4. Role of CL in Apoptosis	63
Objectifs de la thèse	78
MATERIELS ET METHODES	81
1. Culture cellulaire	82
2. Obtention des lignées Knock-Out de TAZ (KO-TAZ)	82
3. Inhibition de l'expression génique de pink-1 par ARN interférents	82
4. RT-qPCR	83
5. Western blot	84
6. Préparation de mitochondries isolées	85
7. Microscopie à fluorescence	85

8. Viabilité cellulaire.....	86
9. Activité de Caspase 9.....	87
10. Production des espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	87
11. Assemblage des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et supercomplexes	88
12. Activités enzymatiques mitochondriales	89
13. Etude de métabolisme des cardiolipines	89
14. Migration cellulaire en insert	89
15. Analyse du cycle cellulaire	90
16. Mesure du métabolisme énergétique mitochondriale	90
17. Tests statistiques	93
RESULTATS PARTIE I	94
Article : Doxorubicin-induced autophagolysosome formation is partly prevented by mitochondrial ROS elimination in DOX-resistant breast cancer cells.....	96
RESULTATS PARTIE II.....	114
Introduction	115
Résultats	116
Discussion	128
RESULTATS COMPLEMENTAIRES	133
Introduction	134
Résultats	135
Discussion	139
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES	142
DONNEES SUPPLEMENTAIRES	148
BIBLIOGRAPHIE	153
ANNEXES.....	167

Abstract

Mitophagy is believed to be a protective mechanism used by certain cancer cells to prevent the induction of mitochondrial apoptosis and therefore the resistance of these cells to certain anticancer treatments. In patients with breast cancer, resistance to doxorubicin (DOX) treatment is an important cause of poor clinical outcomes. The role of mitophagy in the context of DOX resistance in breast cancer cells is not well understood. Therefore, we tried to determine if and how the resistance of breast cancer cells to DOX was associated to the activity of mitophagy. For this purpose, parental (MCF-7) and DOX-resistant (MCF-7dox) breast cancer cell lines were used. On the one hand, we tried to determine whether MCF-7dox were characterized by conditions favoring the induction of mitophagy. On the other hand, we tried to determine whether mitophagic flux was increased specifically in MCF-7dox in response to DOX treatment. Our results show that mitochondrial ROS production and HIF-1 alpha expression are higher in MCF-7dox compared to MCF-7 at basal condition, suggesting that DOX-resistant breast cancer cells are prone to stimuli to induce events related to mitophagy. Our results also showed that in response to DOX, autophagolysosome formation is induced only in MCF-7dox. This stage of mitophagy seems to be, partly, related to an increase in mitochondrial production of ROS induced by DOX treatment because the formation of autophagolysosomes is decreased in the presence of the mitochondrial antioxidant mitoTEMPO.

MCF-7dox resistant cells, compared to MCF-7, are characterized by a decrease in the amount of cardiolipins (CL) accompanied by changes in their composition and a decrease in the amount of tafazzin (TAZ), an important enzyme in CL remodeling. Reprogramming of CL metabolism has been observed in several types of cancer and may be a potential therapeutic target. Therefore, the second objective of my thesis was to study the biological role played by CL metabolism, with particular attention to the remodeling enzyme TAZ, in breast cancer cells in the context of resistance to the DOX. We have observed that the deficiency of TAZ results in a modification in the content and composition of CL in MCF-7 cells, resulting in "immature CL composition". Additionally, TAZ deficiency decreased the sensitivity of MCF-7 cells to DOX. In conclusion, our data suggest the importance of TAZ in the resistance of breast cancer cells in response to DOX.

Keywords : Mitochondria, mitophagy, doxorubicine, cardiolipin, tafazzin, breast cancer, chemoresistance

Résumé

La mitophagie serait un mécanisme protecteur utilisé par certaines cellules cancéreuses pour empêcher l'induction de l'apoptose mitochondriale et donc la résistance de ces cellules à certains traitements anticancéreux. Chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, la résistance au traitement à la doxorubicine (DOX) est une cause importante de mauvais résultats cliniques. Le rôle joué par la mitophagie dans le contexte de la résistance à la DOX dans les cellules cancéreuses du sein n'est pas bien compris. Par conséquent, nous avons essayé de déterminer si et comment la résistance des cellules cancéreuses du sein à la DOX était associée à une stimulation de la mitophagie. Dans ce but, les lignées cellulaires de cancer du sein parentales (MCF-7) et résistantes à la DOX (MCF-7dox) ont été utilisées. Nous avons, d'une part, essayé de déterminer si les MCF-7dox étaient caractérisées par des conditions favorisant l'induction de la mitophagie. D'autre part, nous avons essayé de déterminer si le flux mitophagique était augmenté spécifiquement dans les MCF-7dox en réponse au traitement à la DOX. Nos résultats montrent que la production mitochondriale de ROS et l'expression de HIF-1 alpha sont plus élevées dans les MCF-7dox en condition basale par rapport aux MCF-7, suggérant que les cellules cancéreuses du sein résistantes à la DOX sont sujettes à des stimuli pour induire des événements liés à la mitophagie. Nos résultats ont également montré qu'en réponse à la DOX, la formation d'autophagolysosomes est induite uniquement dans les MCF-7dox. Cette étape de la mitophagie semble être, en partie, liée à une augmentation de la production mitochondriale de ROS induite par la DOX car la formation d'autophagolysosomes est diminuée en présence de l'antioxydant mitochondrial mitoTEMPO.

Les cellules résistantes MCF-7dox, en comparaison des MCF-7, sont caractérisées par une diminution de la quantité de cardiolipines (CL) accompagnée d'une modification de leur composition et d'une diminution de la quantité de la tafazzin (TAZ), une enzyme importante du remodelage de la CL. Une reprogrammation du métabolisme de la CL a été observée dans plusieurs types de cancer et pourrait être une cible thérapeutique potentielle. De ce fait, le deuxième objectif de ma thèse était d'étudier le rôle biologique joué par le métabolisme de la CL, avec une attention particulière à l'enzyme de remodelage TAZ, dans les cellules cancéreuses du sein dans le contexte de la résistance à la DOX. Nous avons observé que l'inactivation de la TAZ entraîne une modification du contenu et de la composition de la CL dans les cellules MCF-7, ce qui entraîne une « composition de CL immature ». De plus, l'inactivation de la TAZ a diminué la sensibilité des cellules MCF-7 à la DOX. En conclusion,

nos données suggèrent l'importance de la TAZ dans la résistance des cellules cancéreuses du sein en réponse à la DOX.

Mots-clés : Mitochondries, mitophagie, doxorubicine, cardiolipine, tafazzin, cancer du sein, chimiorésistance

Liste des abréviations

$\Delta\Psi_m$	Potentiel de la membrane mitochondriale
ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ACLY	Adénosine triphosphate citrate lyase
ADP	Adénosine diphosphate
ADN (mt)	Acide désoxyribonucléique (mitochondriale)
AH	Aconitase
AML	Leucémie myéloïde aiguë
ANT	Adénine nucléotide translocase
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
BCRP	Protéine de résistance au cancer du sein
BNIP3	Bcl-2 interacting protein 3
BNIP3L (NIX)	Bcl-2 interacting protein 3 like
BPR	Benzodiazepine Receptor
CK	Créatine kinase
CyD	Cyclophiline D
CL	Cardiolipine
CoQ	Coenzyme Q
CR	Chaîne respiratoire
CS	Citrate synthase
CSC	Cellules souches cancéreuses
Cyt c	Cytochrome c
DOX	Doxorubicine
DRP1	Dynamin related protein 1
EIM	Espace inter-membranaire
ER	Récepteurs des œstrogènes
ERO	Espèces réactive de l'oxygène
ETC	Chaîne de transport d'électrons
FADH2	Flavin adénine dinucléotide (réduite)
FAS	Acide gras synthase

FBP1	Fructose-1, 6-bisphosphatase
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FH	Fumarate hydratase
Fis1	Mitochondrial fission 1 protein
FMN	Flavine mononucléotide
FMNH2	Flavine mononucléotide (réduite)
FUNDC1	FUN14 domain containing 1
GDH	Glutamate déshydrogénase
GLS	Glutaminase
GPX1	Glutathion peroxydase 1
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
HER2	Récepteurs du facteur de croissance épidermique humain
HIF-1 alpha	Hypoxia inducible factor-1 alpha
HK	Hexokinase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HRE	Elément de réponse hormonale
IDH	Isocitrate déshydrogénase
InsP3R	Inositol triphosphate receptor
KGDHC	Complexe d'α-cétoglutarate déshydrogénase
LC3	Light chain protein 3
LMC	Leucémie myéloïde chronique
MCU	Mitochondrial calcium uniporter
MDH	Malate déshydrogénase
MDR	Multidrug resistance
MEM	Membrane externe mitochondriale
Mff	Mitochondrial fission factor
Mfn	Mitofusin
MIDS	Mitochondrial dynamics proteins
MIM	Membrane interne mitochondriale
MLCL	Monolyso-cardiolipine

MLCLAT1	Monolysocardiolipine acyl transferase 1
MPP	Mitochondrial processing peptidase
MRP1	Multidrug resistance protein 1
MnSOD	Superoxyde dismutase de manganèse
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (réduite)
NDPK-D	Nucléoside diphosphate kinase D
NDP52	Protéine 52 du domaine nucléaire 10
NNT	Nicotinamide nucléotide transhydrogénase
NSCLC	Non-small cell lung cancer
O₂^{°-}	Superoxyde
OH	Radical hydroxyle
Opa-1	Optic atrophy 1
OPTN	Optineurin
OXPHOS	Oxidative phosphorylation
P	Phosphate
PA	Acide phosphatidique
PARL	Presenilin-associated rhomboid-like protein
PC	Phosphatidylcholine
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PDK	Pyruvate déshydrogénase kinase
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEP	Phosphoénolpyruvate
PG	Phosphatidylglycérol
P-gp	Glycoprotéine-p
PI	Phosphatidylinositol
PINK1	PTEN-induced kinase 1
PR	Récepteurs des progestérones
PRDX3	Peroxi-redoxine 3
PS	Phosphatidylsérine
PTP	Pore de transition de perméabilité
RE	Réticulum endoplasmique
SCS	Succinate-CoA synthase

SDH	Succinate déshydrogénase
SOD	Superoxyde dismutase
TCA	Cycle d'acide citrique
TIM	Translocase of the inner membrane
TNBC	Cancers du sein triple négatifs
TOMM20	Translocase of outer mitochondrial membrane 20
TXNRD2	Thiorédoxine réductase 2
TXN2	Thiorédoxine 2
Ub	Ubiquitination
VDAC-1	Voltage-dependent anion-selective channel 1

Liste des figures

Figure 1. Diagramme schématique d'une mitochondrie.....	18
Figure 2. Complexes protéiques de la chaîne respiratoire.....	21
Figure 3. Structure du complexe I de la chaîne respiratoire.....	22
Figure 4. Le cycle Krebs soutient la production d'énergie et la biosynthèse des intermédiaires constituant les macromolécules.....	24
Figure 5. La production des ERO dans les mitochondries.	26
Figure 6. Enzymes antioxydantes mitochondriales impliquées dans l'élimination de l'anion superoxyde.	27
Figure 7. Diagramme schématique montrant une structure hypothétique du PTP mitochondrial.	28
Figure 8. Rôle du complexe Cyt c-CL dans l'apoptose.	30
Figure 9. Activation de l'apoptose mitochondriale via les protéines de la famille Bcl-2.....	31
Figure 10. Fission et fusion mitochondriale.	33
Figure 11. Dégradation des mitochondries par mitophagie.	34
Figure 12. Activation de la mitophagie via la voie PINK1/Parkin.	35
Figure 13. Diverses protéines impliquées dans l'activation de la mitophagie.....	37
Figure 14. La structure interne du sein.	39
Figure 15. Stadification de cancer du sein.....	40
Figure 16. Hétérogénéité de cancer du sein.....	41
Figure 17. Structure de la doxorubicine.	41
Figure 18. Cycle redox de la DOX.....	42
Figure 19. Régulation de HIF-1 dans des conditions de microenvironnement de tumeur hypoxique.	45
Figure 20. Implication de la mitophagie dans la résistance aux traitements anti-cancéreux. .	50
Figure 21. Structure of cardiolipin (CL).	55
Figure 22. Cardiolipin metabolism is a two-step process.	58
Figure 23. Cardiolipin translocation to the outer mitochondrial membrane (OMM) induces mitophagy.....	63
Figure 24. Cardiolipin-mediated apoptotic pathway via Bcl-2 family proteins interaction and cytochrome c release..	65
Figure 25. Altération du métabolisme des CL dans les cellules MCF-7dox.....	79
Figure 26. Schéma représentatif du protocole de traitement par DOX ou S63 des cellules transfecté par si-Pink-1.....	87
Figure 27. Le principe de la mesure de consommation d'oxygène.	91
Figure 28. Le principe de la mesure de l'activité glycolytique.....	92
Figure 29. Increased glycolysis and dysfunctional mitochondria in DOX-resistant breast cancer cells..	104
Figure 30. Mitochondrial ROS production is increased and is associatd to a higher expression of hypoxia inducible factor-1 in DOX-resistant breast cancer cells.	105
Figure 31. In basal condition, there is no difference in mitophagy between the parental and the DOX-resistant breast cancer cell line.	106
Figure 32. Autophagolysosome formation is activated by DOX treatment in DOX-resistant breast cancer cells.....	108
Figure 33. Etude du métabolisme des cardiolipines dans les cellules MCF-7 et MCF-7dox.	117

Figure 34. Effet de l'acide palmitique (AP) et de l'acide linoléique (AL) sur la quantité et la composition des CL dans les cellules MCF-7 et MCF-7dox.	119
Figure 35. Effets de l'inactivation des gènes TAZ, CLS et LCLAT1 sur le métabolisme des CL.	122
Figure 36. Effet de la modification du métabolisme des CL sur la viabilité des cellules.	123
Figure 37. Effet de la modification du métabolisme des CL sur le métabolisme énergétique mitochondrial, l'assemblage des complexes et la quantité des supercomplexes de la chaîne respiratoire.	125
Figure 38. Etude de l'activation de la mitophagie dans les cellules MCF-7 KO-TAZ.	126
Figure 39. Etude de la migration cellulaire dans les cellules MDA-MB-231 KO-TAZ.	127
Figure 40. Etude de la quantité des cardiolipines.	135
Figure 41. Représentation des espèces majeures de CL détectées par spectrométrie de masse.	137
Figure 42. Composition des CL en acide linoléique (A) et acide oléique (B).	138
Figure 43. Schéma récapitulatif des résultats obtenus durant la thèse pour les objectifs 1 et 2.	145
Figure 44. Schéma récapitulatif des résultats obtenus durant la thèse pour l'objectif 3.	146
Figure 45. Schéma hypothétique des mécanismes de la chimiorésistance des cellules MCF-7dox à la doxorubicine.	147
Figure 46. Effet du CoCl ₂ sur l'activité mitophagique des cellules MCF-7dox.	149
Figure 47. Etude de la voie PINK-1 dans l'activité mitophagique des cellules MCF-7dox.	151
Figure 48. Etude du complexe APO-A1/CL sur la quantité et la composition des CL dans les cellules MCF-7dox.	152

Liste des tableaux

Tableau 1. Tableau récapitulatif des différents phospholipides composant les membranes des mitochondries.	20
Tableau 2. Les protéines de la famille Bcl-2.....	31
Tableau 3. Identification des espèces de cardiolipines.	137

INTRODUCTION

Chapitre 1 ; Les mitochondries

Les mitochondries sont des organites situés dans le cytoplasme des cellules et sont essentielles à la vie eucaryote. Elles sont considérées comme les centrales énergétiques de la cellule car elles produisent la plupart de l'énergie sous forme d'ATP requise par la cellule. Les mitochondries ont leur propre génome (ADNmt) qui est répliqué indépendamment du génome de l'hôte. Elles ont également leur propre mécanisme de traduction des protéines, avec des ribosomes, des ARNt et des facteurs protéiques associés. L'ADNmt chez l'homme code pour 13 protéines liées à la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Les protéines mitochondriales restantes sont codées par le génome nucléaire et sont importées dans les mitochondries (Annesley and Fisher 2019).

1. Structure des mitochondries

Les mitochondries font partie des plus gros organites de la cellule, chacune étant de la taille d'une bactérie *E. coli*. La plupart des cellules eucaryotes contiennent de nombreuses mitochondries, qui, collectivement, peuvent occuper jusqu'à 25 % du volume du cytoplasme. La membrane externe définit le périmètre externe lisse de la mitochondrie. En revanche, la membrane interne a de nombreuses invaginations appelées crêtes. Ces membranes définissent deux compartiments sous-mitochondriaux : l'espace inter-membranaire entre la membrane externe et la membrane interne, et la matrice, ou compartiment central (Kühlbrandt 2015) (Figure 1. Diagramme schématique d'une mitochondrie.

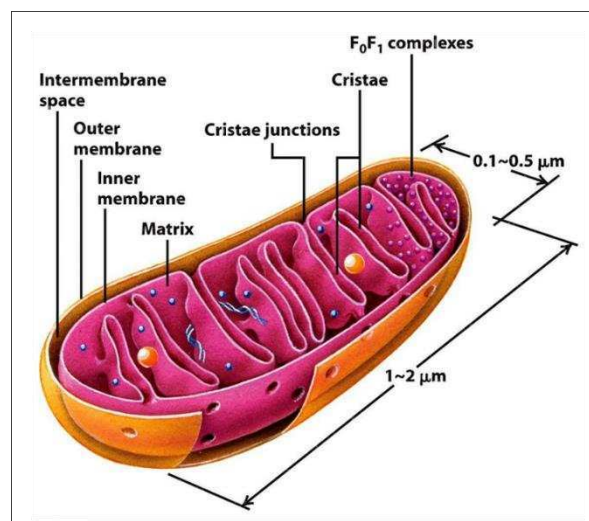


Figure 1. Diagramme schématique d'une mitochondrie.

Modifiée d'après Molecular Cell Biology. W.H. Freeman and Company

1.1) La membrane externe

La membrane externe mitochondriale (MEM) est composée d'une bicouche phospholipidique qui abrite des enzymes métaboliques et des protéines de transport. D'autres composants interviennent dans des actions spécifiques comme l'apoptose et le transfert des lipides entre mitochondries et d'autres organelles notamment le réticulum endoplasmique (Walther and Rapaport 2009). La MEM contient une variété de lipides. Les composants principaux de cette bicouche comprennent la phosphatidylcholine (PC ; 54% des lipides totaux chez les mammifères), la phosphatidyléthanolamine (PE ; 29% des lipides totaux chez les mammifères) et le phosphatidylinositol (PI ; 14% des lipides totaux chez les mammifères). Les autres phospholipides trouvés dans la MEM sont la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylglycérol (PG), la cardiolipine (CL), l'acide phosphatidique (PA), les lysophospholipides, les stérols et la sphingomyéline. Cette composition phospholipidique reste relativement similaire entre les différentes espèces (mammifères, plantes et levures) (Horvath and Daum 2013). Indépendamment de son abondance, chaque lipide joue un rôle important dans les fonctions de la MEM. La membrane externe est poreuse et librement traversée par des ions et de petites molécules non chargées à travers des protéines membranaires formant des pores (porines), comme le canal anionique VDAC (Bayrhuber et al. 2008). Toutes les molécules plus grosses, en particulier les protéines, doivent être importées par des translocases spéciales.

1.2) La membrane interne

La membrane interne mitochondriale (MIM) est une barrière de diffusion étanche à tous les ions et molécules. Ceux-ci ne peuvent passer qu'à l'aide de protéines de transport membranaires spécifiques d'un ion ou d'une molécule particulière. En raison de cette sélectivité ionique, un gradient électrochimique (-180-200 mV) se forme de part et d'autre de la MIM. La MIM a une plus grande surface par rapport à la MEM et cela forme des plis internes (crêtes) qui délimitent la matrice mitochondriale. Le rapport phospholipides/protéines est inférieur dans la MIM par rapport à la MEM dans tous les types de cellules (Kühlbrandt 2015). L'une des principales caractéristiques de la MIM est qu'elle abrite les protéines qui composent la chaîne de transport d'électrons (ETC) et le système de phosphorylation de l'ADP en ATP. La composition lipidique de la MIM varie de celle de la MEM (**Tableau 1. Tableau récapitulatif des différents phospholipides composant les membranes des mitochondries.**). Ainsi, bien que la PC et la PE restent les phospholipides les plus abondants, la concentration en PE est légèrement plus élevée dans la MIM que dans la MEM. À l'inverse, la quantité de PI est plus faible. Mais la plus grande différence concerne la concentration en CL qui est très largement plus importante dans la MIM (environ 15 à 20 % de la masse totale des phospholipides) (Horvath and Daum

2013). Cet enrichissement de CL dans la MIM se retrouve dans tous les organismes eucaryotes. Les raisons de cette différence seront discutées plus loin.

Phospholipides	Localisation	% dans les membranes mitochondriales
phosphatidylcholine (PC)	MEM et MIM	54%
phosphatidyléthanolamine (PE)	MEM et MIM (plus abondant dans MIM)	29%
phosphatidylinositol (PI)	MEM et MIM (plus abondant dans MEM)	14%
cardiolipine (CL)	Principalement dans MIM, légèrement trouvé dans MEM	15 à 20%
phosphatidylsérine (PS)	MEM et MIM	~1%
phosphatidylglycérol (PG)	MEM et MIM	<1%
Acide phosphatidique (PA)	MEM et MIM	<1%
lysophospholipides	MEM	<1%
Stérols	MEM	
Sphingomyéline	MEM	

Tableau 1. Tableau récapitulatif des différents phospholipides composant les membranes des mitochondries.

2. Production d'ATP

Les mitochondries sont le principal site de production de l'ATP (**Figure 2**). Les réactions du cycle de Krebs qui ont lieu dans la matrice mitochondriale génèrent des équivalents réduits ($\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ et FADH_2) et des précurseurs pour la synthèse de lipides, glucides, protéines et nucléotides. Le $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ et le FADH_2 alimentent l'ETC pour générer un gradient électrochimique nécessaire pour la production d'ATP (Kaback 1980).

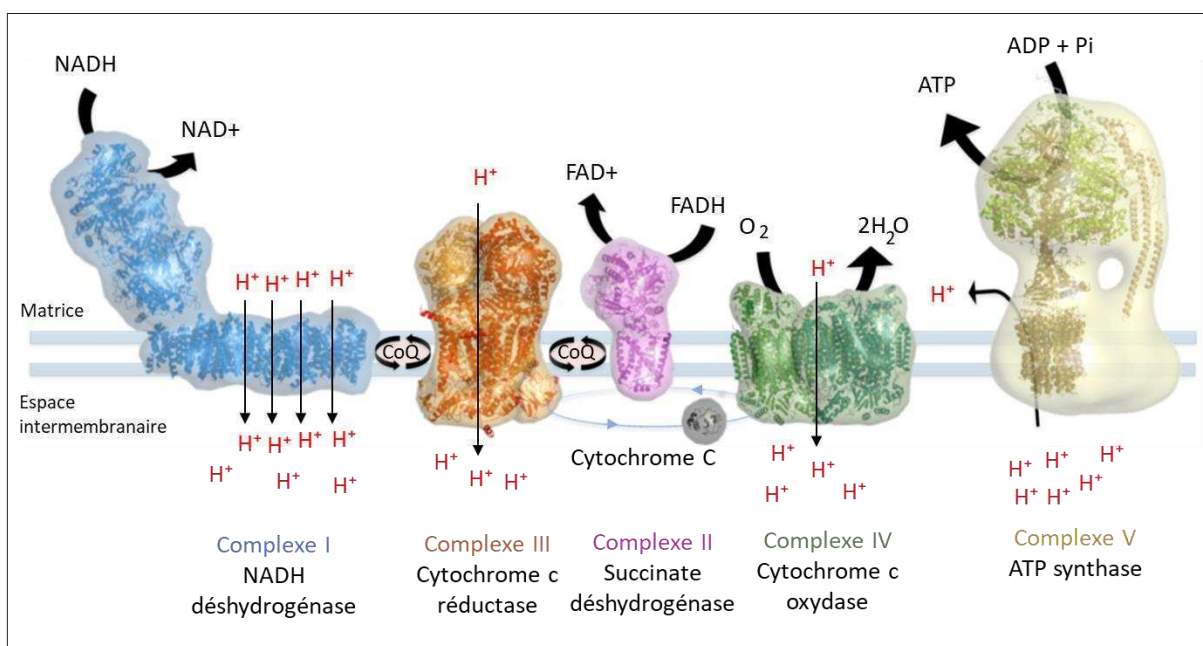


Figure 2. Complexes protéiques de la chaîne respiratoire. Les complexes de transport d'électrons I, II, III, IV et l'ATP synthase mitochondriale forment le système de phosphorylation oxydative. Les complexes I, III et IV pompent les protons à travers la membrane interne, créant le gradient de protons qui constitue la force proton-motrice permettant la synthèse d'ATP.

2.1) La chaîne respiratoire (CR) ou ETC

La chaîne respiratoire est composée de quatre complexes détaillés ci-dessous ;

✓ Complexe I - NADH déshydrogénase (coenzyme Q (CoQ) réductase)

Le complexe I est composé de 45 sous-unités (**Figure 3**). Parmi celles-ci, 14 ont des activités catalytiques et sont appelées « sous-unités essentielles », dont sept sont hydrophobes (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 et ND6) et codées par le génome mitochondrial, et les sept autres sont hydrophiles (Signes and Fernandez-Vizarra 2018). Les sous-unités restantes sont appelées « sous-unités non-essentiels ». Elles sont importantes pour l'assemblage et la stabilité du complexe I et sont codées par le génome nucléaire (Stroud et al. 2016). Le complexe I reçoit deux atomes d'hydrogène du NADH, qui est oxydé, libérant deux électrons et réduisant la flavine mononucléotide (FMN) en FMNH_2 . Ce dernier transfère les électrons au CoQ, via

ses centres Fe / S. L'énergie obtenue au passage des électrons est utilisée par le Complexe I pour transporter quatre protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire (EIM), ce qui représente un flux de deux protons pour chaque NADH consommé (Vinothkumar, Zhu, and Hirst 2014).

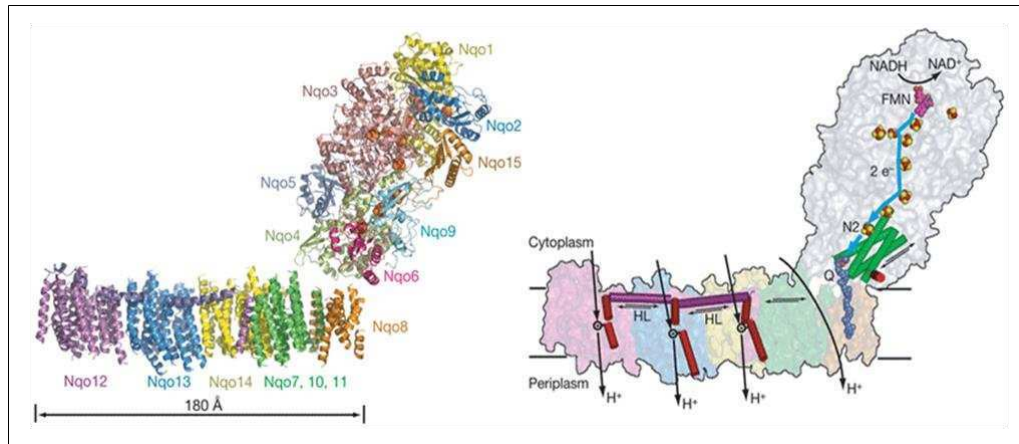


Figure 3. Structure du complexe I de la chaîne respiratoire. Le complexe I est composé de 45 sous-unités. L'association des sous-unités permet la formation de complexe I fonctionnelle.

(Efremov, Baradaran, and Sazanov 2010)

✓ **Coenzyme Q (CoQ)**

Le CoQ est un composant liposoluble de la membrane interne des mitochondries qui est essentiel au transport d'électrons dans l'ETC. Le CoQ transporte les électrons du complexe I ou II au complexe III (Kröger and Klingenberg 1973).

✓ **Complexe II – succinate déshydrogénase (SDH)**

Le complexe II est composé de quatre sous-unités codées par le génome nucléaire, avec deux sous-unités catalytiques hydrophiles, SDHA / SDH1 et SDHB / SDH2, et deux sous-unités hydrophobes, SDHC / SDH3 et SDHD / SDH4. Il contient un groupe hème b et deux sites de liaison au CoQ. Il fait également partie du cycle de Krebs. Le complexe II contribue au transfert d'électrons, mais il n'y a pas de pompage de protons vers l'EIM. Les deux électrons produits lors de l'oxydation du succinate en fumarate sont directement transférés au CoQ (Van Vranken et al. 2015).

✓ **Complexe III - Complexe du cytochrome bc1 (cytochrome c réductase)**

Le complexe III est un dimère symétrique et chaque sous-unité est composée de trois noyaux catalytiques (MT-CYB, CYC1 et UQCRFS1) et de sept sous-unités surnuméraires. Ce

complexe reçoit des électrons du CoQ et les transfère au cytochrome c. Parallèlement il transporte quatre protons vers l'EIM (Sousa, D'Imprima, and Vonck 2018).

✓ **Cytochrome c**

Le cytochrome c (cyt c) est une protéine hème hydrophile située à la surface externe de la MIM. Il transfère des électrons entre les complexes III et IV (Margoliash et al. 1973).

✓ **Complexe IV - Cytochrome c oxydase**

Le complexe IV est composé de 13 ou 14 sous-unités. Ce complexe transfère quatre électrons (fournis par quatre molécules de cytochrome c) directement à l'O₂ (accepteur final des électrons dans la chaîne respiratoire), le réduisant à deux molécules de H₂O, qui consomme quatre protons (prélevés dans la matrice mitochondriale) (Belevich, Verkhovsky, and Wikström 2006).

2.2) Le système de phosphorylation oxydative

Il est constitué de la CR et de l'ATP synthase.

✓ **Complexe V - ATP synthase**

Le complexe V est composé de deux domaines distincts. Le domaine F₁ qui est extrinsèque à la MIM et se trouve dans la matrice, et le domaine F_o qui est intrinsèque à la MIM. F₁ est composé de neuf sous-unités, tandis que F_o a deux sous-unités. L'ATP synthase est le complexe où l'ATP est produit à partir des substrats ADP + H₂PO₄⁻ + H⁺ grâce à la force proton-motrice générée par le retour des protons de l'EIM à la matrice mitochondriale en fonction de leur potentiel électrochimique (Signes and Fernandez-Vizarra 2018; Mitchell 2011).

2.3) Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs (ou cycle d'acide citrique ; TCA) est le processus le plus important qui se déroule dans la matrice mitochondriale. Le cycle de Krebs sert de point de convergence et intègre de multiples sources de « carburant » dérivées de l'alimentation, notamment le glucose, la glutamine et les acides gras. Grâce à diverses réactions biochimiques, le cycle produit des intermédiaires qui sont des éléments constitutifs de la synthèse des macromolécules, ainsi que des accepteurs d'énergie et d'électrons qui sont utilisés dans des processus cellulaires en aval tels que les réactions de la chaîne de transport d'électrons (**Figure 4**). Les trois sources principales qui alimentent le cycle de Krebs sont le glucose, la glutamine et les acides gras (Anderson et al. 2018).

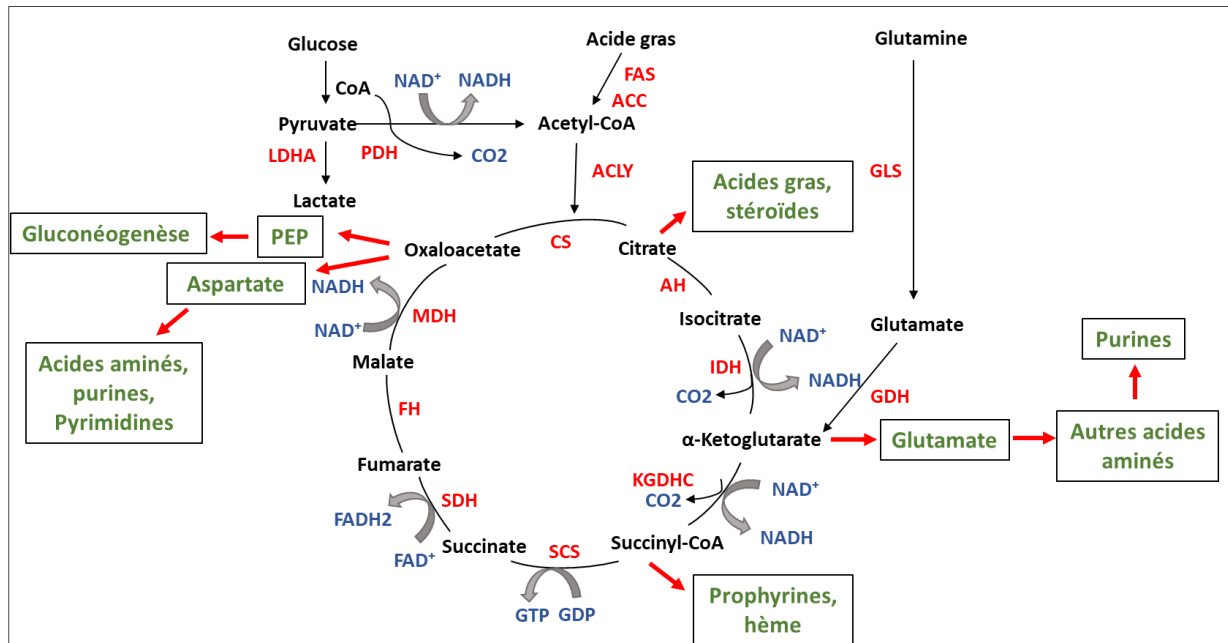


Figure 4. Le cycle Krebs soutient la production d'énergie et la biosynthèse des intermédiaires constituant les macromolécules. Il sert non seulement à produire des équivalents réduits pour alimenter l'ETC (flèches grises), mais aussi à générer des intermédiaires biosynthétiques nécessaires au fonctionnement cellulaire (flèches rouges). Abréviations : CS : citrate synthase, AH : aconitase, IDH : isocitrate déshydrogénase, KGDHC : Complexe d' α -cétoglutarate déshydrogénase, SCS : succinate-CoA synthase, SDH : succinate déshydrogénase, FH : fumarate hydratase, MDH : malate déshydrogénase, PDH : pyruvate déshydrogénase, ACLY : adénosine triphosphate citrate lyase, ACC : acétyl-CoA carboxylase, FAS : acide gras synthase, GLS : glutaminase, GDH : glutamate déshydrogénase, PEP : phosphoénolpyruvate.

3. Les espèces réactive de l'oxygène (ERO)

Le terme « ERO » fait référence à une classe de molécules hautement réactives contenant de l'oxygène et ayant une demi-vie moyenne très courte. Les principaux ERO sont le superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les mitochondries sont considérées comme les plus importants producteurs de superoxyde dans les cellules (Murphy 2009).

3.1) Mitochondries en tant que producteurs d'ERO

Le superoxyde mitochondrial, l'ERO proximal, est principalement produit dans l'ETC à partir de la fuite d'électrons aux sites de liaison à l'ubiquinone du complexe I et du complexe III pendant le transport d'électrons (**Figure 5**). La production de superoxyde se produit principalement par le don d'un électron unique à partir de porteurs d'électrons totalement réduits ou partiellement réduits, tels que la semiquinone, à l' O_2 . La cinétique de production de l'ion superoxyde est très dépendante de la concentration d' O_2 dans les cellules. Étant hautement réactif, $O_2^{\cdot-}$ est immédiatement converti en H_2O_2 soit spontanément, soit sous l'effet de la catalyse de la superoxyde dismutase (SOD) mitochondriale (Murphy 2009). A haute concentration, les ERO ont des effets toxiques et peuvent provoquer des lésions sur l'ADN, les protéines et la membrane cellulaire (Magder 2006). Cependant, il existe des preuves solides soutenant le rôle de signalisation des ERO mitochondriaux comme mode de communication entre les mitochondries et les processus cellulaires impliqués dans le maintien de l'homéostasie et l'adaptation aux conditions de stress (Shadel and Horvath 2015). Premièrement, l' H_2O_2 joue un rôle dans la voie de signalisation permettant la régulation de l'expression des gènes nucléaires. L' H_2O_2 mitochondrial régule également la modification post-transcriptionnelle des protéines par oxydation des groupes thiol des cystéines, modifiant ainsi l'activité des protéines cibles et, par conséquent, la réponse finale. Les ERO mitochondriaux agissent aussi comme un signal de déclenchement de l'autophagie favorisant la survie cellulaire (Finkel 2012).

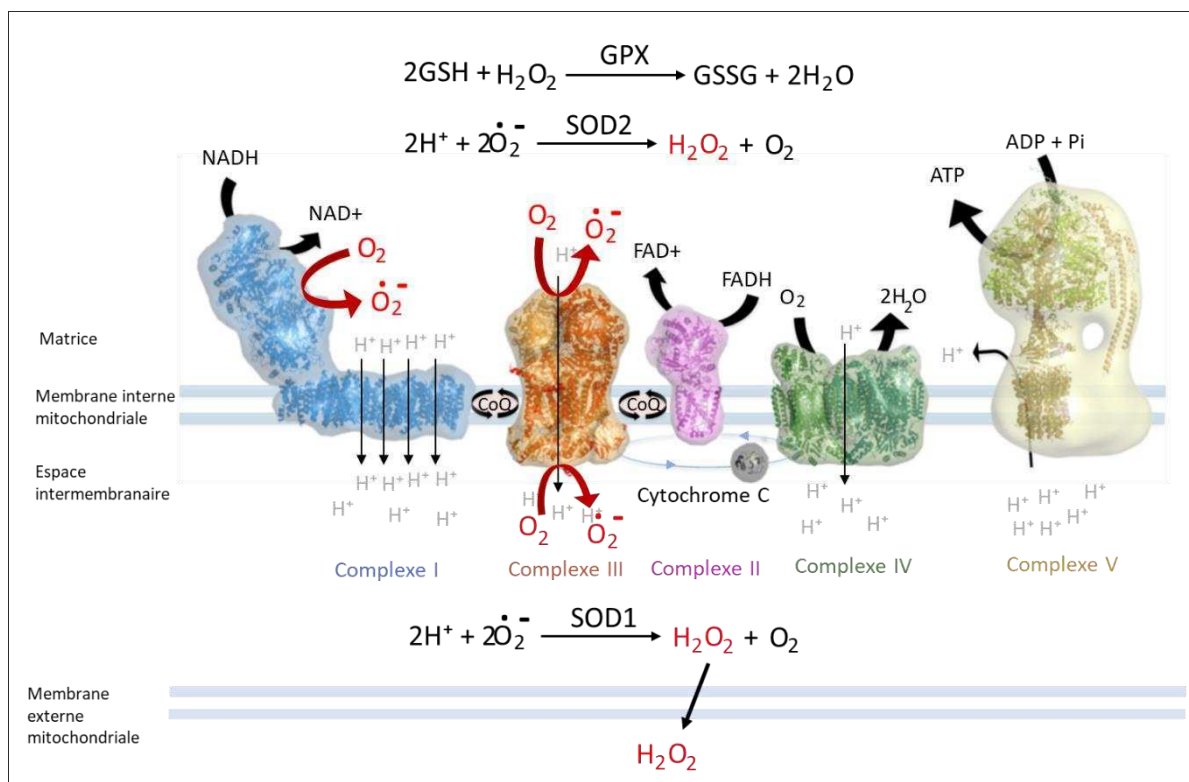


Figure 5. La production des ERO dans les mitochondries. Les électrons s'échappent pendant le transport d'électrons au sein des complexes I et III et génèrent l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$) à partir de l'oxygène (O_2) à la fois dans l'espace intermembranaire et dans la matrice. L' $\text{O}_2^{\bullet -}$ est immédiatement transformé en H_2O_2 soit spontanément, soit sous la catalyse des superoxyde dismutase SOD1 (dans l'espace intermembranaire) ou SOD2 (dans la matrice). Dans la matrice, H_2O_2 peut être neutralisé par le glutathion (GSH).

3.2) Défenses anti-oxydantes dans les mitochondries

Afin de maintenir l'équilibre entre la production d'ERO et leurs conséquences néfastes, les cellules abritent des mécanismes de défense spécifiques (**Figure 6**). Ils protègent ainsi les cellules des dommages aux lipides, aux protéines et aux acides nucléiques, et l'induction de cassures d'ADN double brin. Le superoxyde produit dans les mitochondries est réduit en H_2O_2 par SOD1 dans l'EIM et dans le cytosol, et par SOD2 (MnSOD) dans la matrice mitochondriale. H_2O_2 est ensuite réduit en H_2O via le système TXN (PRDX3 / TXNRD2 / TXN2) ou le système GSH (GPX / GR / GSH) (Kim 2010). Le système thiorédoxine couplé aux peroxiredoxines catalyse la réduction de H_2O_2 en H_2O en présence de NADPH, et se compose de peroxydases de thiorédoxine, de thiorédoxine réductases et des substrats de la thiorédoxine et de la peroxiredoxine. Les mitochondries ont leur propre thiorédoxine réductase spécifique (ThxR2) pour la régulation redox et la peroxiredoxine pour la réduction des peroxydes. Enfin, dans le cytosol, la GSH peroxydase catalyse la conversion de H_2O_2 en H_2O en utilisant le GSH comme

substrat, qui est réduit en GSSG puis régénéré avec l'utilisation de NADPH par la GSH réductase. Ainsi, la synthèse du GSH et la production de NADPH soutiennent activement l'inactivation de H_2O_2 . Le NADPH, l'équivalent réducteur de ces systèmes est régénéré par le nicotinamide nucléotide transhydrogénase (NNT) au détriment du gradient de protons inter-membranaire et du NADH (Kim 2010).

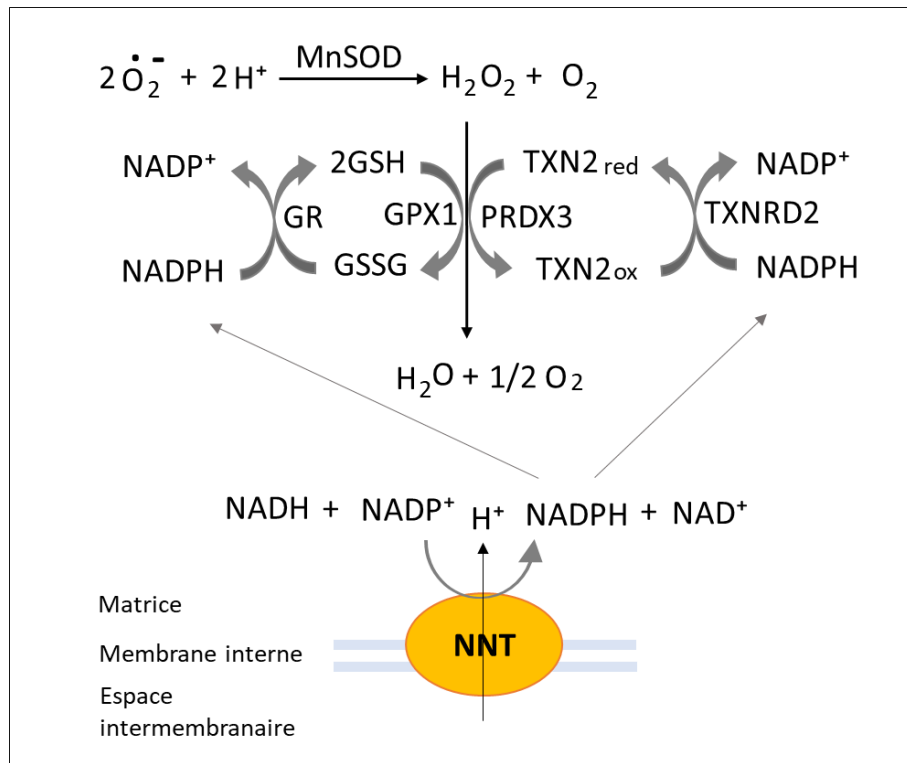


Figure 6. Enzymes antioxydantes mitochondriales impliquées dans l'élimination de l'anion superoxyde. Abréviations : MnSOD, superoxyde dismutase de manganèse ; GPX1, glutathion peroxydase 1 ; GR, glutathion réductase ; GSH, glutathion ; PRDX3, peroxiredoxine 3, TXNRD2, thiorédoxine réductase 2 ; TXN2, thiorédoxine 2 ; NNT, nicotinamide nucléotide transhydrogénase.

4. Mitochondries et mort cellulaire

4.1) Le pore de transition de perméabilité (PTP)

La transition de perméabilité mitochondriale est un phénomène qui permet aux mitochondries de subir une augmentation soudaine de la perméabilité aux solutés de masse moléculaire ≤ 1500 Da entraînant un gonflement des organites et des modifications structurales (Vianello et al. 2012). Bien que tous les acteurs moléculaires ne soient pas connus, le PTP semble impliquer la coopération de différentes protéines. Les principaux composants putatifs, décrits jusqu'à présent, comprennent VDAC ou la porine, localisée dans la membrane mitochondriale externe ; le translocateur de nucléotides d'adénine (ANT) dans la membrane mitochondriale interne ; le récepteur périphérique des benzodiazépines (BPR); l'hexokinase liée à la porine (HK); la cyclophiline-D (CyD) et la créatine kinase (CK) (Pour plus d'information sur la structure de PTP voir article de (Bernardi et al. 2015)) (**Figure 7**). L'ouverture du PTP entraîne différentes conséquences, telles que la perte du potentiel électrochimique, le découplage de la phosphorylation oxydative, la baisse de l'ATP et la libération de solutés de la matrice (déterminant la déplétion en Ca^{2+}). Une ouverture de longue durée induirait une dépolarisation permanente de la membrane suivie du déploiement des crêtes, d'un gonflement de la matrice et de la libération du cytochrome c et de facteurs apoptogènes, qui conduisent à la mort cellulaire programmée (Vianello et al. 2012).

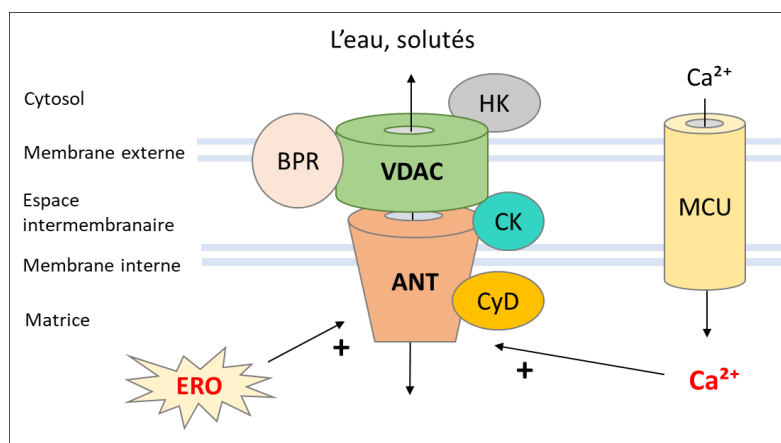


Figure 7. Diagramme schématisant une structure hypothétique du PTP mitochondrial. Le calcium et les ERO conduisent à l'ouverture du PTP mitochondrial et à l'initiation de la mort cellulaire. Abréviations : BPR, Benzodiazepine Receptor ; VDAC, Voltage Dependent Anion Channel ; ANT, adénine nucléotide translocase ; HK, Hexokinase ; CK, Créatine kinase ; CyD, Cyclophiline D ; MCU, mitochondrial calcium uniporter (Modifié d'après Vianello et al. 2012).

✓ **Régulation du PTP par le Ca^{2+}**

L'ouverture du PTP peut-être induite après une accumulation de calcium dans la mitochondrie. La première fonction liée à la transition de perméabilité est donc la libération de Ca^{2+} en dehors de la mitochondrie. Le Ca^{2+} est le second messenger le plus important dans toutes les cellules eucaryotes. Ainsi, le contrôle de sa concentration cytoplasmique est crucial pour réguler de nombreuses activités enzymatiques et donc plusieurs processus vitaux tels que l'expression génique, le contrôle métabolique, la plasticité cellulaire, la motilité, la prolifération et la mort cellulaire. Son niveau est contrôlé par les canaux Ca^{2+} de la membrane plasmique, ou via la libération des réserves intracellulaires, telles que le réticulum endoplasmique et sarcoplasmique. Les mitochondries coopèrent dans l'homéostasie et la signalisation du Ca^{2+} et, dans ce contexte, le PTP fonctionne comme un canal de Ca^{2+} en favorisant la libération de Ca^{2+} (Lemasters et al. 2009).

✓ **Régulation du PTP par les ERO**

Les ERO modulent l'ouverture du PTP en oxydant différents sites. Il faut considérer que les ERO agissent en synergie avec le Ca^{2+} . En effet, les ERO augmentent la concentration cellulaire de Ca^{2+} . Ensuite, au-delà d'un niveau seuil, le Ca^{2+} déclenche des ouvertures transitoires du PTP. Cette ouverture, si elle est prolongée, pourrait déclencher une cascade d'événements déclenchant la mort cellulaire programmée (McStay, Clarke, and Halestrap 2002).

4.2) Cytochrome C

Le Cyt c est une macromolécule globulaire constituée d'environ 100 résidus d'acides aminés (Santucci et al. 2019). Il est capable d'exercer diverses fonctions en fonction de sa localisation cellulaire et des conditions dans lesquelles il opère. Le Cyt c agit entre la membrane mitochondriale interne et externe des cellules, où avec une CL il forme un complexe qui intervient dans le transfert d'électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire. La libération de Cyt c des mitochondries est une étape fondamentale pour le début du processus apoptotique par la « voie intrinsèque ». Les changements structuraux au niveau du complexe Cyt c-CL confèrent une activité peroxydase au Cyt c qui va favoriser la peroxydation des CL. Cette peroxydation des CL dissocie le Cyt c du complexe et permet sa libération dans le cytosol afin de déclencher le processus apoptotique (Santucci et al. 2019). À ce jour, la nature des événements qui modifient la fonction du Cyt c est toujours débattue. Néanmoins, il est évident que l'oxydation des CL est nécessaire pour la libération du Cyt c de la membrane mitochondriale (Ott, Zhivotovsky, and Orrenius 2007). La plus faible affinité des phospholipides oxydés pour la protéine favorise la dissociation du complexe et la libération du Cyt c (et d'autres protéines

mitochondriales) dans le cytosol, conduisant à la mort cellulaire (**Figure 8**). Dans le cytosol, le Cyt c interagit avec le facteur d'activation de la protéase apoptotique 1 (Apaf-1), forme l'apoptosome et active les caspases (Olteanu et al. 2003). Dans un premier temps, la caspase initiateur-9 est recrutée et activée. Puis les caspases effectrices-3 et -7 transmettent le signal de mort en clivant d'autres protéines (Bratton and Salvesen 2010) .

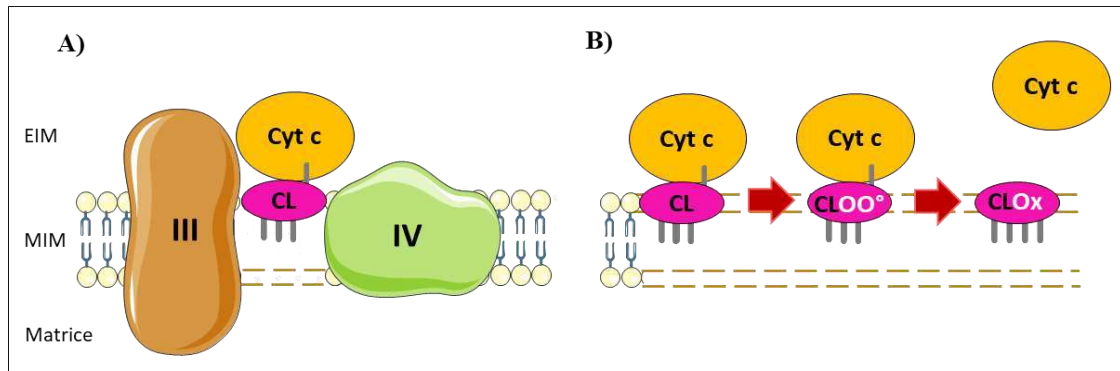


Figure 8. Rôle du complexe Cyt c-CL dans l'apoptose. Le complexe Cyt c-CL permet le transfert des électrons dans l'ETC. La dissociation du complexe suite à la peroxydation des CL par le Cyt c et les ERO aboutit à libération de Cyt C dans le cytosol afin de déclencher le processus apoptotique. Abréviations : EIM : espace inter-membranaire, MIM: membrane interne de mitochondrie, CL: cardiolipine, Cyt c: cytochrome c.

4.3) Protéines de la famille Bcl-2

La translocation du Cyt c dans le cytosol nécessite la perméabilité de la MEM, un événement régulé par les protéines de la famille Bcl-2 (Green and Kroemer 2004) (**Figure 9**). Cette famille est composée d'au moins 18 membres qui se répartissent en trois groupes différents selon la fonction qu'ils exercent et le nombre de domaines d'homologie (BH) dont ils disposent (**Tableau 2**) (brièvement, groupe 1: protéines anti-apoptotiques comme Bcl- 2 et Bcl-xL; groupe 2: protéines pro-apoptotiques, comme Bak et Bax; groupe 3: protéines BH3 uniquement (only BH3 proteins) et qui contiennent toutes un domaine BH3 conservé, à la seule exception de Bid). Pour plus de détails sur le fonctionnement des protéines de la famille Bcl-2 voir l'article de (Glab, Cao, and Puthalakath 2020).

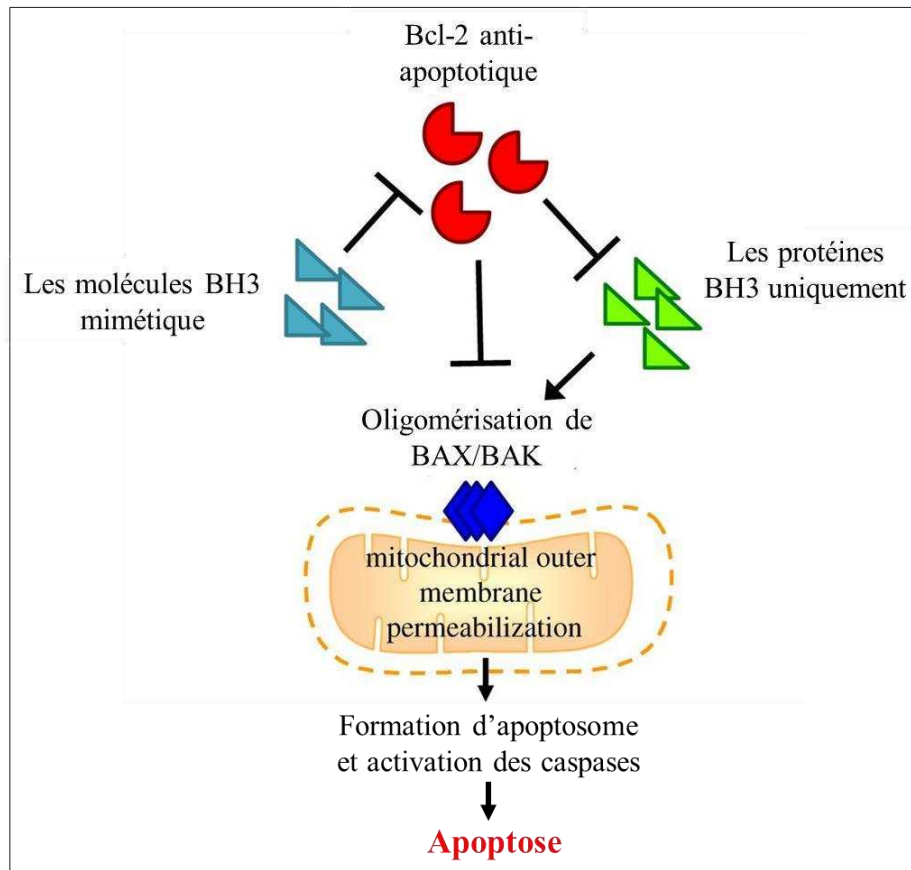


Figure 9. Activation de l'apoptose mitochondriale via les protéines de la famille Bcl-2. Les stress apoptotiques favorisent l'accumulation de protéines BH3 conduisant à l'oligomérisation de BAX / BAK et la perméabilisation de la MEM. L'activation des protéines anti-apoptotique va empêcher l'activité des protéines pro-apoptotique et l'oligomérisation de la MEM par BAX/BAK. L'inhibition des protéines Bcl-2 anti apoptotique permettra l'activation de l'apoptose.

Modifié d'après (Campbell and Tait 2018)

Pro-apoptotique	Anti-apoptotique
BAX	BCL-2
BAK	BCL-XL
BCL-XS	BCL-W
BAD	MCL-1
BID	BFL-1
PUMA	BCL-B
BIK	
BIM	
HRK	
NOXA	
BMF	

Protéines BH3-only

Tableau 2. Les protéines de la famille Bcl-2.

5. Dynamique des mitochondries

Les mitochondries sont des organites dynamiques qui se déplacent dans la cellule, se divisent, fusionnent et subissent un renouvellement régulé, notamment, par la mitophagie. Elles peuvent également être échangées entre les cellules (Chan 2012; Mao et al. 2013).

5.1) Fission et fusion mitochondriale

✓ Fission

La fission mitochondriale est le processus au cours duquel les mitochondries se divisent en deux ou plusieurs structures indépendantes, permettant la création de nouvelles mitochondries (**Figure 10A**). Pendant la fission, les mitochondries sont divisées en entités plus petites, un processus essentiel pour augmenter leur nombre dans les cellules en division. La fission favorise également l'élimination des mitochondries par mitophagie, facilite le mouvement des mitochondries à travers le réseau cytosquelettique et régule l'apoptose et l'homéostasie du Ca^{2+} . Le processus est initié par l'actine et le réticulum endoplasmique (RE) qui définit d'abord le site de division sur la MEM. Une fois que le contact entre le RE et les mitochondries est établi par VDAC à la surface mitochondriale et le récepteur d'inositol 1,4,5-trisphosphate InsP_3R à la surface du RE, le RE libère du Ca^{2+} dans la mitochondrie pour déclencher la polymérisation de l'actine au site de constriction. Cela fournit un site pour le recrutement et l'assemblage de la protéine 1 liée à la dynamine (DRP1), une GTPase cytosolique qui se transmet à la MEM lors de l'activation. DRP1 recrute ensuite la protéine réceptrice Fis1 ancrée dans la membrane, le facteur de fission mitochondrial ancré à la queue (Mff) et les protéines dynamiques mitochondriales ancrées (MiDs). Ensemble, ces protéines entourent en spirale la mitochondrie, la resserrant et la brisant en deux morceaux (Youle and van der Bliek 2012; Steffen and Koehler 2018; Yoon et al. 2003).

✓ Fusion

La fusion mitochondriale caractérise la fusion de plusieurs mitochondries voisines, qui mélange le contenu de mitochondries partiellement endommagées (**Figure 10B**). Au cours de la fusion, la MEM et la MIM fusionnent, et le contenu de l'EIM et de la matrice mitochondriale est mélangé. Ce processus est contrôlé par trois GTPases de la famille des dynamines, les mitofusine (Mfn) 1 et 2 dans la MEM et la protéine d'atrophie optique 1 (Opa1) dans la MIM. Il existe deux isoformes longues (L-Opa1) et trois isoformes courtes (S-Opa1) pour Opa1. La fusion des MEM est synchronisée avec la fusion des MIM. Les protéines de fusion sont régulées par l'ubiquitination des protéines de la MEM et le clivage protéolytique des protéines de la MIM. Lorsque deux mitochondries sont à proximité, Mfn1 et Mfn2 commencent à se dimériser avec des interactions homo- et hétérotypiques, ce qui crée des connexions antiparallèles entre

les mitochondries, permettant la fusion de la MEM en mélangeant les bicouches lipidiques. Une interaction supplémentaire des deux mitochondries de fusion avec le RE peut faciliter le processus, car Mfn2 a également été trouvé dans le RE où il favorise l'interaction entre les mitochondries et le RE et permet l'échange de Ca^{2+} pour la signalisation. La fusion des MIMs est alors assurée par Opa1 ainsi que Mfn1 (Chen et al. 2003; Koshiba et al. 2004; Cipolat et al. 2004).

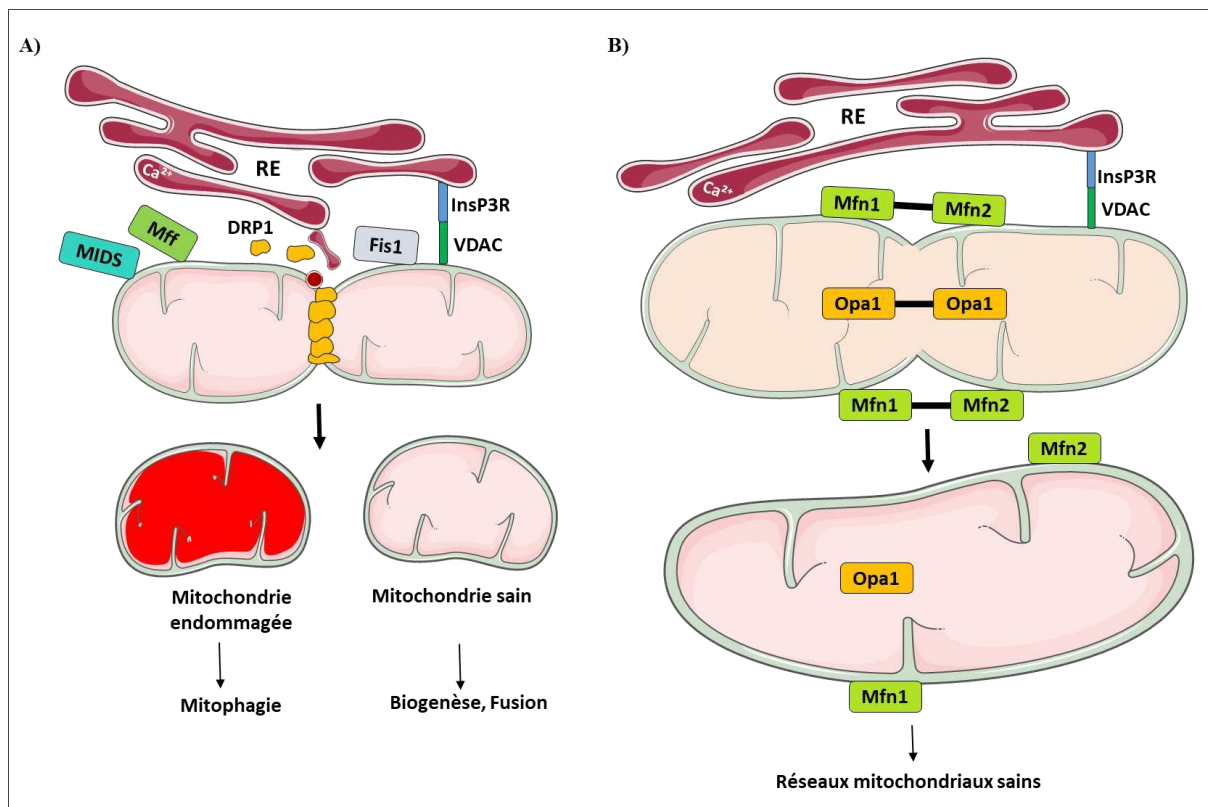


Figure 10. A) fission et B) fusion mitochondriale. Abréviations : RE, réticulum endoplasmique ; VDAC, Voltage dependent anion channel ; Fis1, mitochondrial fission 1 protein ; Mff, mitochondrial fission factor ; MIDS, mitochondrial dynamics proteins ; DRP1, dynamin related protein 1 ; InsP3R, inositol triphosphate receptor ; Mfn, mitofusin ; Opa-1, Optic atrophy 1.

5.2) Mitophagie

Le contrôle de la qualité de la dynamique mitochondriale comprend également la mitophagie, c'est-à-dire un processus de dégradation qui élimine les mitochondries dysfonctionnelles ou endommagées ou en excès (**Figure 11**). Ce processus est essentiel pour garantir les fonctions physiologiques des cellules et des tissus et pour éviter l'apparition de maladies comme le cancer. Il régule également le nombre de mitochondries en réponse aux besoins métaboliques des cellules et à certains stades du développement cellulaire, comme la différenciation des érythrocytes. L'élimination mitochondriale utilise le plus souvent la machinerie moléculaire de la macro-autophagie, un type spécifique d'autophagie caractérisé par la formation de mitophagosomes, c'est-à-dire des structures à double membrane qui forment des vésicules autour des mitochondries. Les mitophagosomes seront ensuite dégradés via la voie lysosomale.

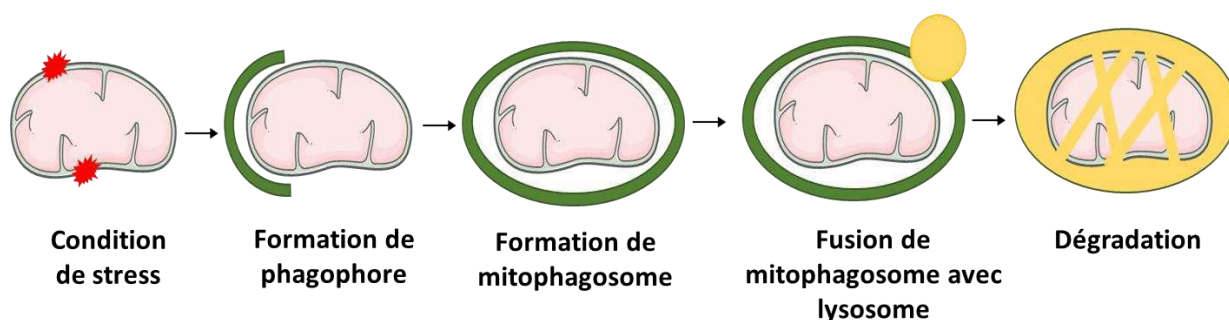


Figure 11. Dégradation des mitochondries par mitophagie.

Il existe différentes voies d'activation de mitophagie dont les mécanismes moléculaires sont détaillés ci-dessous ;

✓ Voie PINK1/Parkin

La voie PINK1 / Parkin est la voie la plus étudiée de la mitophagie. La kinase putative 1 (PINK1) induite par la sérine / thréonine PTEN (serine/threonine PTEN-induced putative kinase 1) est l'initiateur de cette voie. Si la mitochondrie est saine (polarisée), PINK1 est transporté du cytosol vers la matrice mitochondriale par des translocases de la MEM (TOM) et de la MIM (TIM). Lors du franchissement de la MIM, il est clivé et relâché dans le cytosol par la protéase mitochondriale préséniline associée à la protéine rhomboïde (PARL) et la matrice de traitement peptidase (Matrix Processing Peptidase) (MPP). Si, au contraire, la mitochondrie est dysfonctionnelle, MIM se dépolarise, PINK 1 n'est pas clivé et ne peut pas être transporté vers l'EIM. Il s'accumule dans la MEM. Là, il peut recruter et activer Parkin en phosphorylant les ubiquitines résidant à MEM et Parkin lui-même. Parkin est une ubiquitine-ligase cytosolique E3 qui, une fois activée, commence à ubiquitiner les protéines de la MEM, y compris Mfn1, Mfn2, VDAC1, TOM20 et Rho GTPase 1 mitochondriale, initialisant la mitophagie. Enfin, la

polyubiquitination des protéines mitochondriales sera reconnue par les protéines adaptatrices p62, NDP52 et OPTN (Wong and Holzbaur 2014). L'interaction de ces protéines adaptatrices avec LC3 permet la formation de mitophagosome qui sera ensuite dégradé par la machinerie autophagique (Geisler et al. 2010) (**Figure 12**).

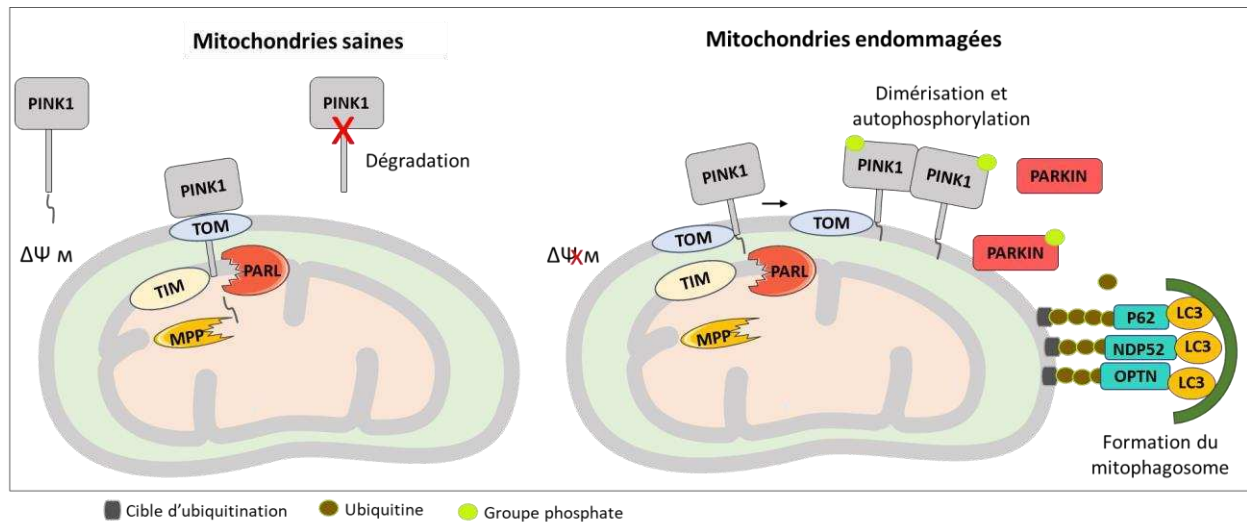


Figure 12. Activation de la mitophagie via la voie PINK1/Parkin. Abréviations ; PINK1-PTEN-induced kinase 1, MPP-Matrix processing peptidase, PARL-Presenilin-associated rhomboid-like protein, TOM-Translocase of the outer membrane, TIM-Translocase of the inner membrane, NDP52-Protéine 52 du domaine nucléaire 10, OPTN-Optineurin, LC3-chaîne légère de protéine 1 associée aux microtubules 3, $\Delta\Psi_M$ -potentiel de la membrane mitochondriale.

✓ Voie BNIP3/NIX

BCL2 / adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (BNIP3) et BNIP3-like (NIX) sont des protéines contenant des LIR (LC3 interacting region) situées au niveau de la MEM qui sont capables de se lier directement à LC3 et de déclencher la mitophagie sans nécessité d'ubiquitination de protéines ou d'autres adaptateurs (**Figure 13**) (Schwarten et al. 2009; Novak et al. 2010). BNIP3 et NIX sont tous les deux sous la régulation transcriptionnelle du facteur 1 alpha inducible par l'hypoxie (HIF1-alpha), et sont donc supposés médier la mitophagie déclenchée par l'hypoxie (Sowter et al. 2001). Cependant, dans des conditions particulières, BNIP3 et NIX sont également sous la régulation transcriptionnelle de FOXOa3 ou NF-kB, suggérant leur participation à des voies de signalisation en dehors de l'hypoxie (Chaanine et al. 2016:3; Dhingra Rimpay et al. 2013). La phosphorylation de BNIP3 et NIX dans leur domaine LIR (sérines 17 et 24 pour BNIP3 et sérines 34 et 35 pour NIX) augmente leur affinité pour la liaison LC3 et permet le recrutement de cette protéine sur la membrane externe de la mitochondrie, favorisant ainsi, l'activation de mitophagie (Zhu et al. 2013).

✓ **Voie FUNDC1**

Le domaine FUN14 contenant 1 (FUNDC1) est une autre protéine de la MEM capable de se lier directement à LC3 et de déclencher la mitophagie (**Figure 13**) (Liu et al. 2012). Tout comme BNIP3 et NIX, FUNDC1 peut également déclencher une mitophagie induite par l'hypoxie même s'il ne s'agit pas d'une cible d'HIF1-alpha et que sa phosphorylation dans le domaine LIR (sérine 17) peut augmenter son affinité pour LC3 (Wu et al. 2014). L'interaction de FUNDC1 avec DRP1 favorise également la fragmentation mitochondriale et la mitophagie (Chen et al. 2016).

✓ **Voie médiée par les cardiolipines (CL)**

La CL est capable d'interagir directement avec les protéines LC3 lors de leur translocation de la MIM vers la MEM (**Figure 13**). La translocation des CL vers la MEM est médiée par la protéine hexamérique de l'espace intermembranaire NDPK- D (mitochondrial nucleoside diphosphate kinase) (Kagan et al. 2016). L'interaction des CL avec LC3 au niveau de la MEM déclenche l'activation de la mitophagie (Chu, Bayır, and Kagan 2014). Les détails de ces mécanismes moléculaires seront discutés dans le chapitre 4 « la partie ; Role of CL in Mitochondrial Quality Control ».

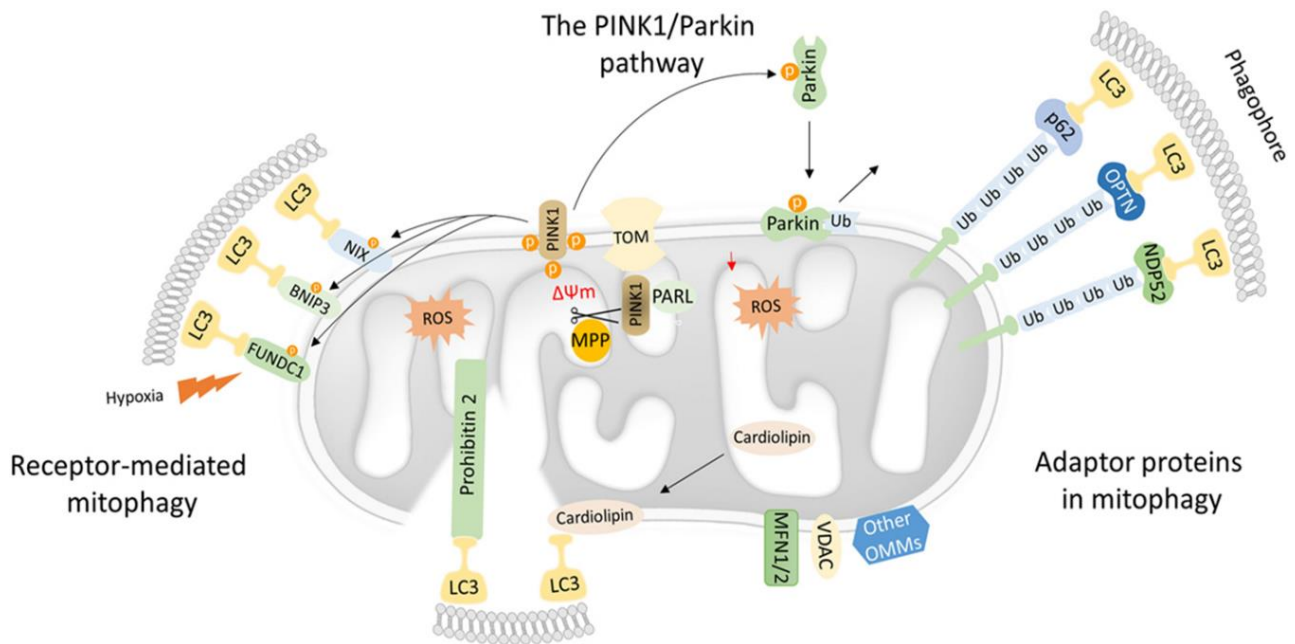


Figure 13. Diverses protéines impliquées dans l'activation de la mitophagie. LC3, light chain protein 3 ; BNIP3, Bcl-2 interacting protein 3 ; BNIP3/NIX, Bcl-2 interacting protein 3 like ; FUNDC1, FUN14 domain containing 1, MPP, mitochondrial processing peptidase ; PINK1, PTEN induced kinase 1 ; TOM, translocase of outer mitochondrial membrane ; PARL, Presenilins-associated rhomboid-like protein ; Ub, ubiquitination ; OPTN, optineurine ; NDP52, nuclear dot protein 52 kDa ; $\Delta\Psi_m$, potentiel de membrane mitochondriale ; P, phosphate.

Source ; (Gkikas, Palikaras, and Tavernarakis 2018)

Chapitre 2 ; Cancer du sein et doxorubicine

1. Cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes et le deuxième cancer le plus courant parmi tous les types de cancer. Ils représentent une cause importante de mortalité avec plus de 1 300 000 cas et 450 000 décès chaque année dans le monde (Banin Hirata et al. 2014).

1.1) Anatomie et stadification du cancer du sein

✓ Anatomie du sein

Le sein est composé de glandes mammaires entourées d'un stroma de tissu conjonctif (Alex, Bhandary, and McGuire 2020) (**Figure 14**).

- Glandes mammaires : les glandes mammaires se composent d'une série de canaux et de lobes sécrétoires. Chaque lobe est constitué de nombreux lobules drainés par un seul canal galactophore. En période d'allaitement, ces canaux galactophores transportent le lait jusqu'au mamelon.
- Stroma du tissu conjonctif : le stroma du tissu conjonctif est une structure de support qui entoure les glandes mammaires. Il a un composant fibreux et gras.
- Le stroma fibreux se condense pour former des ligaments suspenseurs. Ces ligaments ont deux fonctions principales :
 - Attachez et fixez le sein au derme et au muscle sous-jacent.
 - Séparez les lobules sécréteurs du sein.
- Fascia pectoral : la base du sein repose sur le fascia pectoral, une feuille plate de tissu conjonctif associée aux muscles pectoraux. Il agit comme un point d'attache pour les ligaments suspenseurs.

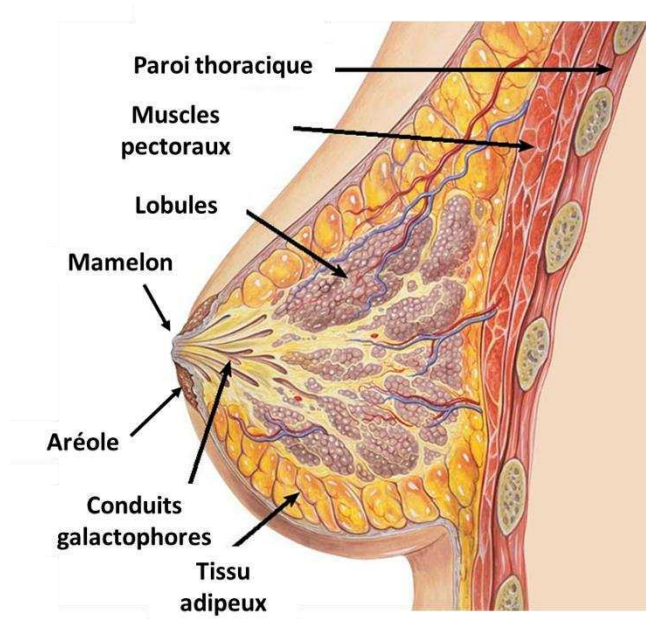


Figure 14. La structure interne du sein.

Source ; e-cancer.fr

✓ **Stadification du cancer du sein**

Les tumeurs du sein sont classées histologiquement en fonction de leur lieu d'origine. Les tumeurs canalaire se développent dans les canaux mammaires et représentent 80 % des tumeurs. Les tumeurs lobulaires se développent à l'intérieur des lobules et représentent 10 à 15 % des cas. Les autres sous-types représentent moins de 10 % des cas diagnostiqués par an (Vargo-Gogola and Rosen 2007). Les stades du cancer du sein sont exprimés sous forme de nombre sur une échelle de 0 à IV en fonction de la taille, de la localisation et du caractère invasif (**Figure 15**), le stade 0 décrivant les cancers localisés et non-invasifs et le stade IV décrivant les cancers invasifs qui se sont propagés hors du sein à d'autres parties du corps. Les patientes atteintes de carcinome canalaire invasif présentent une atteinte lymphatique plus élevée et un pronostic plus mauvais que les types moins courants de carcinome du sein (Polyak 2007).

Les stades de cancer du sein sont présentés ci-dessous (Polyak 2007) ;

- Stade 0 : les cellules cancéreuses du canal mammaire ne se sont pas propagées au tissu mammaire.
- Stade I : les cellules cancéreuses sont propagées au tissu mammaire. La taille des tumeurs est inférieure à 2 centimètres de diamètre.
- Stade II : les cellules cancéreuses sont propagées au tissu mammaire. La taille des tumeurs est comprise entre 2 à 5 centimètres de diamètre.
- Stade III : la taille des tumeurs est supérieure à 5 centimètres de diamètre. Le cancer s'est propagé au ganglion lymphatique axillaire.

- **Stade IV** : le cancer s'est propagé au-delà du sein vers des organes éloignés. Métastases préférentielles au cerveau, aux poumons, au foie et aux os.

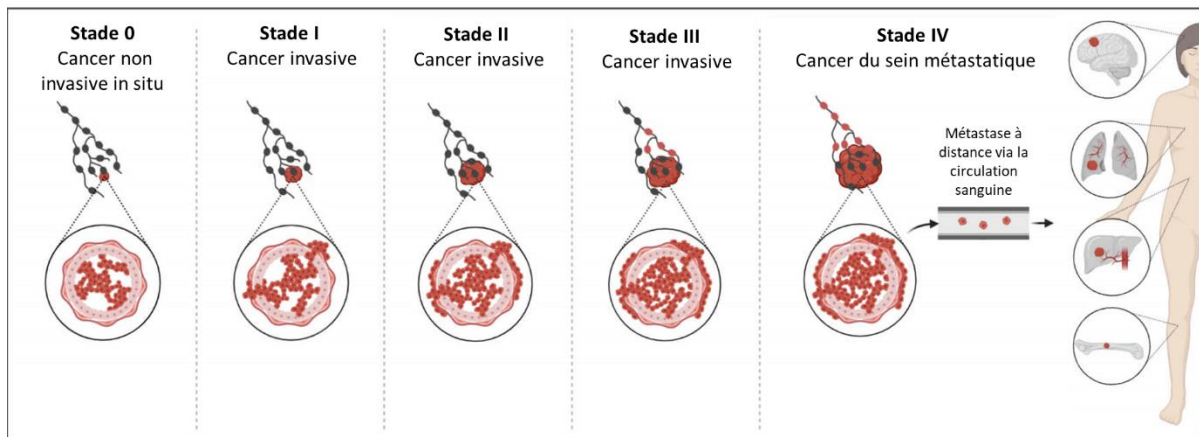


Figure 15. Stadification de cancer du sein. Source ; BioRender.com

1.2) Hétérogénéité du cancer du sein

Des études immunohistochimies ont divisé les cancers du sein en trois types principaux avec des pourcentages et des pronostics différents : 1) Récepteurs des œstrogènes (ER +) et de la progestérone (PR +) positifs, 2) Récepteurs du facteur de croissance épidermique humain 2 positifs (HER2 +) et 3) Cancers du sein triple négatifs (TNBC) (**Figure 16**). Les cancers du sein exprimant à la fois ER et PR représentent environ 85% de tous les cancers du sein et sont divisés en deux sous-types : luminal A, qui comprend le cancer du sein ER + et / ou PR + et HER2-, et se caractérise par la faible expression de Ki-67 marqueur de prolifération et luminal B, qui comprend les tumeurs mammaires ER + et / ou PR +, HER2 + (ou HER2-), montrant une expression élevée de Ki-67 et un pronostic plus mauvais que Luminal A. Les HER2 + et les TNBC représentent environ 15% des cancers du sein (Goldhirsch et al. 2011). Les cancers du sein à récepteurs positifs ont le meilleur pronostic, tandis que les TNBC, qui sont le type de cancer du sein le plus hétérogène, ont une récurrence plus élevée et une survie globale plus courte par rapport aux deux autres types (Goldhirsch et al. 2011).

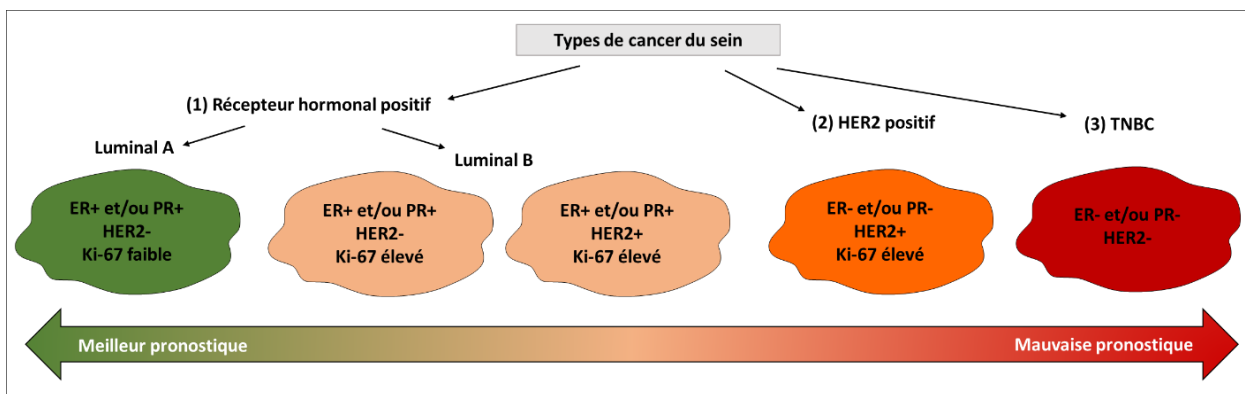


Figure 16. Hétérogénéité de cancer du sein.

2. La doxorubicine (DOX)

La DOX (Adriamycine) (**Figure 17**) fait partie du groupe des anthracyclines qui sont des agents chimiothérapeutiques très efficaces utilisés dans le traitement d'une gamme importante de tumeurs malignes. Les mécanismes qui contribuent à l'effet cytotoxique de ces médicaments sont principalement l'intercalation de l'ADN, l'inhibition de la topoisomérase II et la génération d'ERO. Le principal effet indésirable des anthracyclines est la cardiotoxicité qui est dose-dépendante. Dans le traitement du carcinome du sein, la DOX est l'un des médicaments les plus efficaces dans les tumeurs de stade précoce et tardif (Renu et al. 2018).

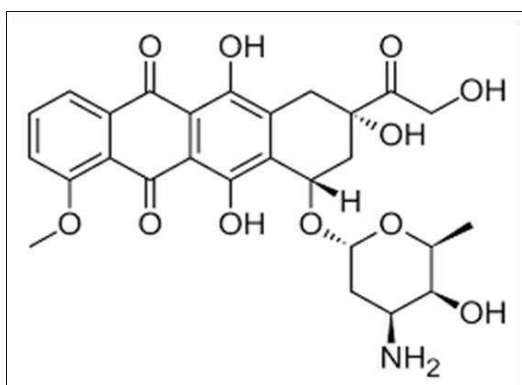


Figure 17. Structure de la doxorubicine.

Source ; Chemsr.com

2.1) Mécanismes d'action

Il existe potentiellement d'autres mécanismes d'action de la DOX. Dans cette partie seulement les mécanismes d'action les plus étudiés dans le cancer du sein sont mentionnés.

✓ Topoisomérase IIa

L'un des mécanismes proposés pour expliquer l'effet de la DOX sur les cellules cancéreuses est l'intercalation dans l'ADN, conduisant ainsi à une perturbation de la réparation de l'ADN médiée par la topoisomérase II. La DOX stabilise le complexe topoisomérase IIa /

ADN, favorisant finalement la formation de cassures d'ADN simple et double brin (Jamieson and Boddy 2011). Ainsi, la topoisomérase IIa peut être considéré comme une cible de la DOX et il est prouvé que la surexpression de la topoisomérase IIa est associée à une efficacité améliorée de traitement avec cet agent thérapeutique (Mukherjee et al. 2010). Il a été démontré que les mutations somatiques de la topoisomérase IIa confèrent une résistance à la DOX (Mao et al. 1999).

✓ Génération des ERO

Il a été démontré que plusieurs enzymes, dont la cytochrome P450 réductase, la NADH déshydrogénase (complexe I) et la xanthine oxydoréductase, pouvaient réduire la DOX via un mécanisme de réduction à un électron, donnant naissance à la semiquinone intermédiaire qui peut rapidement réduire l'oxygène en superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (Kalyanaraman 2019). En présence d'un ion métallique actif redox tel que le fer (III), des radicaux hydroxyles se forment. L'activation redox de la DOX en $O_2^{\cdot-}$, du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de la formation de radicaux hydroxyles catalysés par le fer a été suggérée comme mécanisme de la cytotoxicité induit par la DOX (Mukhopadhyay et al. 2009; Jamieson and Boddy 2011) (**Figure 18**).

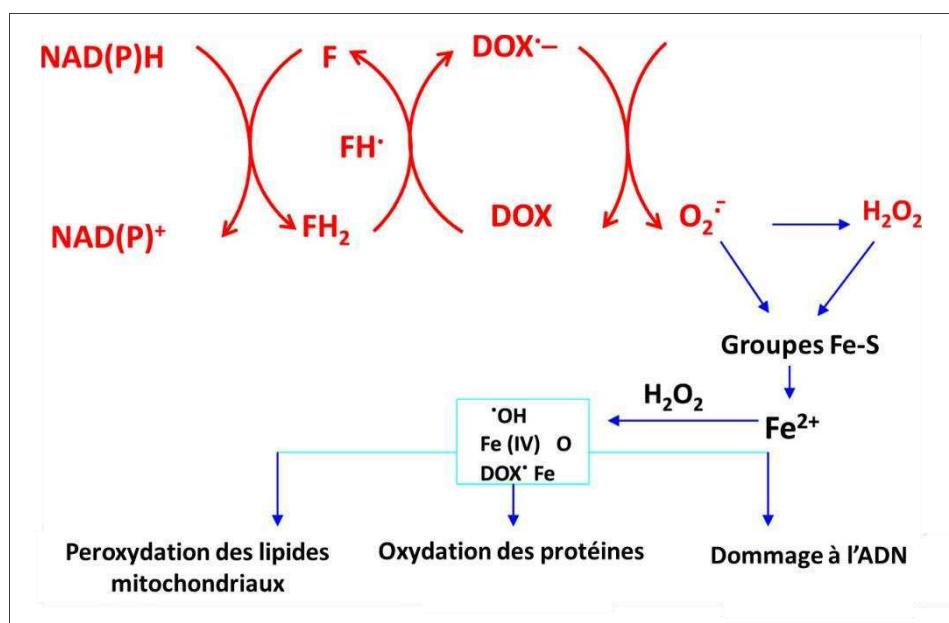


Figure 18. Cycle redox de la DOX.

✓ Les effets sur la voie de l'apoptose Bcl-2 / Bax

D'autres études ont exploré les effets de la DOX sur la voie de l'apoptose Bcl-2 / Bax (Leung and Wang 1999). En traitant la lignée cellulaire du cancer du sein MCF-7 avec la DOX, une diminution de Bcl-2 (protéine anti-apoptotique) a été observée tandis que Bax (protéine pro-apoptotique) augmentait. Il a été démontré que la DOX diminuait les niveaux d'ARNm de

Bcl-2 et que le traitement des cellules MCF-7 avec de la DOX activait la voie p53 suggérant que l'effet de la DOX sur l'expression de Bcl-2 serait médié par les voies de p53.

2.2) Résistance à la DOX

Comme mentionné précédemment, la DOX est actuellement le médicament chimiothérapeutique le plus efficace utilisé pour traiter le cancer du sein. Cependant, il a été démontré que le traitement à base de DOX peut induire une résistance à la drogue entraînant un mauvais pronostic et une mauvaise survie des patients. Il existe de nombreux mécanismes impliqués dans la chimiorésistance induite par la DOX. Dans cette partie nous avons mentionné les mécanismes les plus étudiés.

✓ Rôle des transporteurs d'efflux dans la résistance à la DOX

Les transporteurs d'efflux ATP-dépendants dans les cellules cancéreuses peuvent transporter activement une variété de substrats tel que les médicaments à l'extérieur de la cellule grâce à l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP et peuvent être responsable de résistance aux médicaments. La glycoprotéine-p (P-gp) est le produit du gène de résistance multidrogue (ABCB1 ou MDR1) et a été le mécanisme le plus étudié dans la résistance aux médicaments liée à l'efflux des drogues dans le cancer du sein (Gottesman, Fojo, and Bates 2002). Des études ont révélé qu'environ 40% des cancers du sein expriment la P-gp. La P-gp est trouvée comme un acteur essentiel de la résistance à la DOX (Clarke, Leonessa, and Trock 2005). D'autres transporteurs d'efflux ATP-dépendants tel que la protéine 1 associée à la résistance multidrogue (MRP1) et la protéine de résistance au cancer du sein (BCRP) sont également associées à la résistance à la DOX (Gottesman, Fojo, and Bates 2002). La localisation de MRP1 et BCRP également dans les mitochondries des cellules cancéreuses mammaires résistantes à la DOX (MCF-7dox) diminue l'accumulation de DOX dans les mitochondries et les effets cytotoxiques associés (Dartier et al. 2017).

✓ Rôle des lipides membranaires dans la résistance à la DOX

Des études comparatives entre les lignées cellulaires de cancer du sein résistantes à la DOX et les lignées parentales ont démontré que les changements dans la composition de la membrane plasmique lipidique favorisent la résistance à plusieurs médicaments en altérant l'absorption des médicaments. Les cellules cancéreuses du sein MCF-7 résistantes à la DOX ont des concentrations plus élevées de sphingomyéline et de cholestérol que les cellules sensibles entraînant une membrane plasmique plus rigide et moins perméable (Peetla et al. 2010). L'interaction hydrophobique de la DOX avec les membranes des cellules résistantes, provoque le piégeage du médicament dans la bicouche lipidique. La quantité de palmitate est également augmentée dans les membranes plasmiques des cellules résistantes. Il a été démontré

que l'acide gras synthase est hautement exprimée dans la lignée cellulaire cancéreuse du sein résistant aux médicaments MCF7 / AdVp3000, augmentant la teneur en palmitate, ce qui modulerait la mobilité transversale des composants membranaires et perturberait l'absorption de la DOX (Liu, Liu, and Zhang 2008). La CL a également une forte affinité pour la DOX, ce qui entraîne une absorption de la DOX par les mitochondries et la génération des ERO. La diminution du niveau de CL pourrait diminuer l'internalisation de la DOX dans les mitochondries, diminuant ainsi, l'effet cytotoxique induit par la DOX. Ce point sera traité plus loin dans « le Chapitre 4 ; La Cardiolipine (CL) dans le cancer ».

✓ **Rôle de l'hypoxie dans la résistance à la DOX**

Il a été démontré que l'augmentation de l'expression de HIF-1 α est corrélée à un mauvais pronostic du patient et une augmentation du pouvoir invasif des cellules cancéreuses (Seebacher et al. 2016). Il a été proposé que HIF-1 α puisse être impliqué dans la chimiorésistance à la DOX. En effet, une augmentation de l'expression de Pgp en réponse à HIF-1 α a été observée dans les cellules d'ostéosarcome accompagnée d'une diminution de l'apoptose en réponse à la DOX (Roncuzzi, Pancotti, and Baldini 2014). Dans cette étude, ils ont observé que les cellules résistantes à la DOX maintenues pendant 2 mois dans un milieu de culture sans DOX perdaient leur résistance aux médicaments et que cet effet était associé à l'absence d'expression de HIF-1 α . De plus, les cellules cancéreuses de poumon non à petit cellules (NSCLC) présentent une chimiorésistance au cisplatine et à la DOX qui est induit par la voie HIF (Song et al. 2006). HIF-1 se compose de deux sous-unités, HIF-1 α et HIF-1 β (**Figure 19**). HIF-1 α est sensible à la concentration en oxygène et se dégrade en présence des concentrations importante de l'oxygène. Par conséquent, HIF-1 α détermine l'activité de HIF-1. Le gène codant de la P-gp, MDR1, serait sensible à l'hypoxie. Ainsi, HIF-1 α peut réguler l'expression de la P-gp en se liant aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) sur MDR1 (Comerford et al. 2002). Il a été rapporté que HIF-1 α et HIF-1 β peuvent également se lier avec HRE (élément de réponse hormonale) sur le promoteur du gène BCRP pour initier son expression, puis induire la surexpression de BCRP (Vannini et al. 2008).

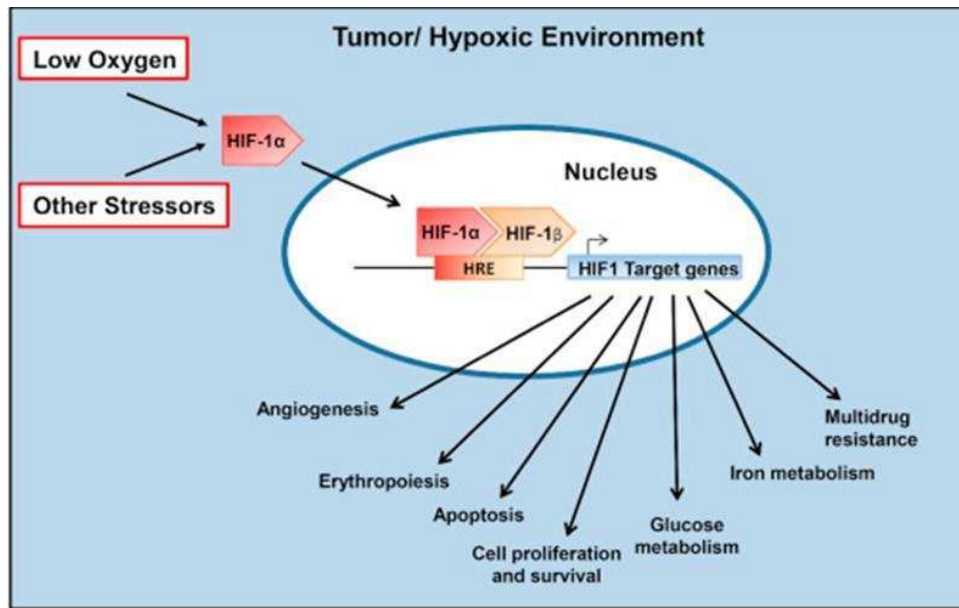


Figure 19. Régulation de HIF-1 dans des conditions de microenvironnement de tumeur hypoxique. Dans des conditions d'hypoxie, le manque d'O₂ conduit à une accumulation de HIF-1α dans le cytoplasme et à une translocation dans le noyau. Dans le noyau, HIF-1α se dimérise avec HIF-1β, qui se lie à HRE dans les promoteurs des gènes cibles. Cela induit la transcription de gènes cibles HIF-1 impliqués dans un large éventail de fonctions cellulaires, y compris l'angiogenèse, l'érythropoïèse, l'apoptose, la prolifération cellulaire, la résistance multidrogue, etc. Source ; Seebacher et al. 2016

✓ Rôle de la mitophagie dans résistance à la DOX

Plusieurs études montrent également une implication de mitophagie dans la résistance à la DOX. Ceci sera discuté dans le chapitre 3, « la partie ; Le rôle de la mitophagie dans la chimiorésistance ».

Chapitre 3 ; Les mitochondries et la chimiorésistance

1. La reprogrammation métabolique dans la chimiorésistance

Les cellules cancéreuses ont une plasticité métabolique très importante qui est régulée, notamment, par le microenvironnement tumoral. Ainsi, ce microenvironnement tumoral influence le métabolisme des cellules cancéreuses qui s'adapte entre la glycolyse et la phosphorylation oxydative mitochondriale pour produire de l'ATP (Avagliano et al. 2019).

1.1) Régulation du métabolisme glycolytique

L'une des caractéristiques de certaines cellules cancéreuses est la reprogrammation du métabolisme glycolytique (Hanahan and Weinberg 2011). La glycolyse, dans la plupart des cancer, devient la voie énergétique prédominante, en présence ou en l'absence d'O₂, assurant la survie et la prolifération (Kroemer and Pouyssegur 2008). Cette caractéristique est connue sous le nom d'« effet Warburg » ou de glycolyse aérobie depuis qu'Otto Warburg a observé pour la première fois que les cellules cancéreuses favorisent la conversion du glucose en lactate par rapport aux cellules normales même en présence d'oxygène (Fu et al. 2021). Malgré un rendement énergétique plus faible, la glycolyse est importante dans les cellules cancéreuses car c'est une source cruciale pour les intermédiaires utilisés pour la synthèse des macromolécules nécessaires à la prolifération et à la migration (Heiden, Cantley, and Thompson 2009).

Il a été montré que le métabolisme glycolytique peut être associé aux mécanismes de chimiorésistance dans de nombreux type de cancer. La modification métabolique dans des cellules cancéreuses du sein résistantes à la DOX s'accompagnerait d'une augmentation de la voie de signalisation FGF/FGFR (Fibroblast Growth Factor-Receptor) et de l'activation de la signalisation en aval contrôlant divers processus oncogènes tels que l'angiogenèse, la résistance au traitement et les métastases. Les études par micropuces à ADN ont montré que le FGFR jouerait un rôle dans l'augmentation du flux glycolytique et de la chimiorésistance à la DOX. Ainsi, le blocage de la signalisation FGF-FGFR-ERK1 par des inhibiteurs pharmacologiques sensibilisait les cellules résistantes au traitement à la DOX (Xu et al. 2018). Par ailleurs, il a été observé que les cellules leucémiques résistantes à la DOX avaient une dépendance plus importante au glucose par rapport aux cellules sensibles (Stäubert et al. 2015). Certaines études suggèrent un lien entre la glycolyse et les transporteurs d'efflux (Bean et al. 2014). Les effets du 3-BrPy, un inhibiteur glycolytique, ont été testés dans des cellules de neuroblastome (NB) résistantes à la DOX. La combinaison des deux traitements 3-BrPy et DOX a inhibé de manière

synergique la viabilité des cellules NB dans des conditions à la fois normoxiques et hypoxiques. De plus, les quantités d'ATP totales et les quantités de lactate ont été réduites lors du traitement combiné (Bean et al. 2014). Ces résultats suggéraient pour les auteurs que le 3-BrPy réduirait les niveaux d'ATP intracellulaire, affectant ainsi la fonction de transporteur d'efflux-ATP dépendante. La reprogrammation du métabolisme glycolytique est également observée dans la chimiorésistance à d'autres agents thérapeutiques. Ainsi, il a été observé dans des cellules cancéreuses du sein triple négative (TNBC) résistantes au paclitaxel que le métabolisme glycolytique était élevé, avec une augmentation de l'absorption du glucose et une augmentation du lactate produit. De plus, il a été proposé qu'une inhibition d'enzymes clés de la voie de la glycolyse aérobie pouvait renforcer l'effet anti-prolifération d'agents chimio-thérapeutiques puisque que le knockdown de la lactate déshydrogénase, dont l'expression était augmentée dans des cellules TNBC résistantes au paclitaxel, sensibilise ces cellules au paclitaxel (Zhou et al. 2010). Les cellules cancéreuses gastriques résistantes au cisplatine semblent dépendre également fortement de la glycolyse. En effet, le fait d'éliminer le glucose de leur milieu de culture suffit pour diminuer la résistance de ces cellules (Qian et al. 2017). L'énolase 1 est une enzyme de la glycolyse. Il a été montré qu'une diminution de la glycolyse via le knockdown de l'énolase 1 diminuait la résistance à la cisplatine de cellules cancéreuses gastriques (Qian et al. 2017). D'autres études montrent également que le métabolisme des cellules leucémiques résistantes au sorafénib se caractérise par une demande accrue en glucose (You et al. 2019). Ceci a aussi été observé dans les cellules cancéreuses de la prostate résistantes au flavopiridol (Li et al. 2017). L'ensemble de ces études suggèrent que la diminution de la glycolyse aérobie dans les cellules résistantes pourrait améliorer leur sensibilité à la chimiothérapie.

1.2) Régulation d'ETC et OXPHOS

Certaines cellules cancéreuses présentent des niveaux élevés de glycolyse et, par conséquent, il a été initialement suggéré que l'OXPHOS était altérée dans tous les cancers. Cependant, il y a de plus en plus de preuves qui montrent une OXPHOS correcte ou augmentée dans de nombreux types de cancer (Weinberg and Chandel 2015; Moreno-Sánchez et al. 2007). De plus, de nombreux cancers, tels que le cancer de poumon non à petit cellules (NSCLC), présentent une hétérogénéité métabolique au sein des tumeurs (Hensley et al. 2016). Des études sur le cancer du pancréas suggèrent également que les tumeurs présentent une hétérogénéité métabolique et que cela concerne notamment des sous-populations de cellules souches cancéreuses (CSC) pour lesquelles leur fort potentiel métastatique et tumorigène serait liés à leur dépendance à l'OXPHOS (Viale, Corti, and Draetta 2015). Ces cellules CSC dépendantes d'OXPHOS sont connues pour provoquer une résistance thérapeutique dans les cancers. Des études métaboliques montrent que les cellules cancéreuses de la prostate résistantes au docétaxel, ont un phénotype mitochondrial plus efficace que les cellules sensibles et que l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire par la metformine diminue la prolifération et le caractère invasif des cellules (Ippolito et al. 2016). Il a été montré également que les cellules leucémie myéloïde aiguë (AML) résistantes à la cytarabine présentent des niveaux élevés d'OXPHOS et que le ciblage du métabolisme mitochondrial renforçait les effets anti-leucémiques de la cytarabine (Farge et al. 2017). Dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) résistante à l'imatinib (tyrosine kinase inhibiteur), la présence de CSC a été détectée. Dans ces cellules, l'OXPHOS est augmentée et est nécessaire pour leur survie puisque l'utilisation d'un traitement combiné par l'imatinib et la tigécycline (un antibiotique qui inhibe la traduction des protéines mitochondriales) permet d'éliminer les CSC et de sensibiliser les cellules AML au traitement (Kuntz et al. 2017). Dans les cellules cancéreuses du sein triple négatives, les CSC sont également responsables de la résistance à la chimiothérapie en augmentant l'OXPHOS mitochondrial, la production de ROS et en induisant l'expression de HIF1 α (Lee et al. 2017).

Dans ces cancers résistants au traitement, l'inhibition d'OXPHOS peut être une stratégie thérapeutique efficace afin d'améliorer la réponse aux traitements.

Un exemple de ces stratégies thérapeutiques est la metformine. La metformine est un médicament hypoglycémiant dont l'activité antitumorale a été observée dans de nombreuses études. Il a été montré que la metformine exerce ses effets anticancéreux en inhibant l'OXPHOS, en particulier, en inhibant l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire (Bridges et al. 2014). Il a été montré que dans les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-468, l'utilisation de la metformine inhibent sélectivement les CSC du cancer du sein (Hirsch et al.

2009). La combinaison de la metformine et de la DOX induit la mort des CSC et des cellules cancéreuses non souches in vitro. La même stratégie de traitement dans un modèle de souris xénograft a montré une réduction importante de la masse tumorale et empêche la réapparition de la maladie de façon beaucoup plus efficace que le traitement avec la DOX seule (Hirsch et al. 2009). Il a également été rapporté que la surexpression des gènes OXPHOS dans les cellules cancéreuses du sein augmente la résistance à la metformine, tandis que les cellules avec une expression élevée des gènes glycolytiques sont plus sensibles au médicament (Wheaton et al. 2014).

Différemment, il a été observé que les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 deviennent plus résistantes en réponse à la roténone (inhibiteur du complexe I). Il a été observé que l'augmentation de l'activité d'OXPHOS par la forskoline (activateur d'adénylate cyclase) rend ces cellules plus sensibles à la mort cellulaire induite par la roténone (Palorini et al. 2013). De ce fait, certaines études soutiennent l'idée que la restauration de la fonction d'OXPHOS pourrait sensibiliser des cellules tumorales en réponse aux traitements. Par exemple, dans les carcinomes hépatocellulaires, la suppression de la PDK (pyruvate déshydrogénase kinase) inhibe la transformation du glucose en lactate et active l'OXPHOS, permettant ainsi la sensibilisation des cellules en réponse au sorafenib (Shen et al. 2013). De même, il a été montré que la restauration de la fonction OXPHOS par le dichloroacetate (inhibiteur de pyruvate déshydrogénase kinase) induit la production d'ERO dans les cellules MCF-7 et la mort cellulaire apoptotique associée (Bonnet et al. 2007).

L'ensemble de ces études montrent que non seulement l'OXPHOS est fonctionnelle dans certains types de cancer, mais aussi que son fonctionnement serait associé, selon le type de cancer, à la chimiorésistance.

2. Le rôle de la mitophagie dans la chimiorésistance

Le rôle de la mitophagie dans la tumorigénèse et la survie des cellules cancéreuses semble être dépendant du stade de la tumeur. Dans les cellules saines, la mitophagie est généralement considérée comme anti-tumorigène, utilisée par la cellule pour dégrader sélectivement les mitochondries dysfonctionnelles et empêcher l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène favorisant les tumeurs (Chourasia, Boland, and Macleod 2015; Vara-Perez, Felipe-Abrio, and Agostinis 2019). Cependant, dans les cellules cancéreuses et dans des conditions où les mitochondries sont des cibles des molécules thérapeutiques, la mitophagie peut éviter l'action de ces molécules (Chourasia, Boland, and Macleod 2015).

Historiquement, la mitophagie a été considérée comme un mécanisme de protection utilisé par les cellules cancéreuses pour éviter l'induction de l'apoptose mitochondriale. La plupart des traitements anticancéreux provoquent directement ou indirectement un dysfonctionnement mitochondrial dans le but de déclencher les signaux de la mort cellulaire. L'élimination des mitochondries dysfonctionnelles par mitophagie pourrait ainsi, empêcher l'initiation de la cascade apoptotique. Par conséquent, l'induction de la mitophagie en réponse à des thérapies anticancéreuses peut moduler leurs capacités cytotoxiques et contribuer à la résistance à ces traitements (**Figure 20**).

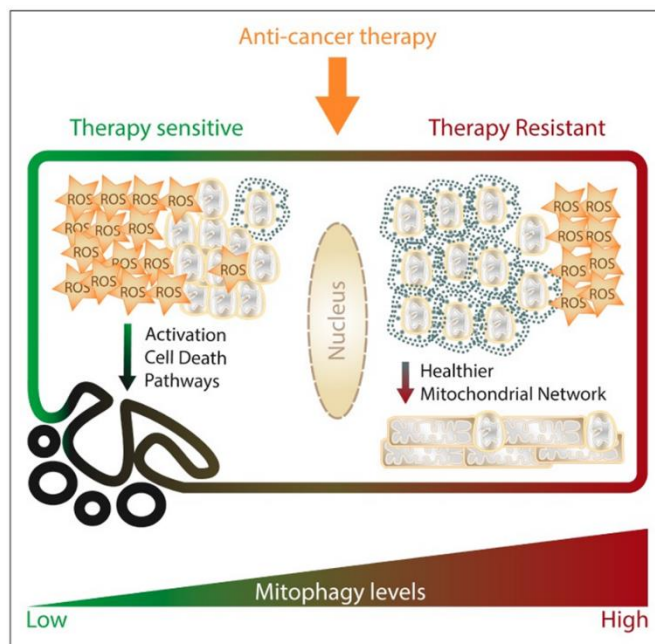


Figure 20. Implication de la mitophagie dans la résistance aux traitements anti-cancéreux. Source ; (Vara-Perez, Felipe-Abrio, and Agostinis 2019)

Il a été montré que l'inhibition génétique des voies de la mitophagie sensibilise les cellules cancéreuses colorectales HCT116 à la mort cellulaire induite par la cisplatine (Abdrakhmanov et al. 2019; Wu et al. 2016). L'inhibition de la mitophagie médiée par PINK1

/ Parkin contribue à la radio-sensibilisation des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-157 (Zheng et al. 2015). De plus, une inhibition des principaux récepteurs de la mitophagie tels que PINK1 et FUNDC1 chimiosensibilise les cellules cancéreuses du col de l'utérus à la cisplatine, soutenant le rôle pro-survie de la mitophagie dans les cellules cancéreuses en réponse à la chimio / radiothérapie (Hou et al. 2017; MacKeigan, Murphy, and Blenis 2005). Par ailleurs, il a été observé qu'une augmentation de la mitophagie contribuait à la résistance au cisplatine et à l'étoposide dans des cellules cancéreuses de poumon alors que sa diminution re-sensibilisait les cellules cancéreuses résistantes HepG2/ADM et MCF-7/ADR en réponse à la molécule apoptotique B5G1 (Villa et al. 2017; Yao et al. 2019). Dans des cellules cancéreuses de prostate traitées par du docétaxel, l'induction de la mitophagie réduit leur sensibilité à ce traitement (Cristofani et al. 2018). Différentes voies de mitophagie peuvent être engagées pour contrer les dommages mitochondriaux et contribuer à la résistance thérapeutique des cellules cancéreuses. Il a ainsi été montré que la surexpression de la protéine 5 interagissant avec Opa (OIP5) limite la mort cellulaire induite par le docétaxel dans les cellules cancéreuses gastriques en activant la mitophagie médiée par MFN2 / PINK1 (Kim et al. 2017). De plus, la mitophagie médiée par NIX entraîne une résistance à la DOX dans les cellules cancéreuses colorectale HCT8. Il a aussi été observé que l'ubiquitine-ligase E3 ARIH1 - plutôt que Parkin - médie la mitophagie induite par PINK1 en réponse au cisplatine/étoposide (Yan et al. 2017; Villa et al. 2017). L'ensemble de ces études suggère que l'expression de certains récepteurs ou médiateurs de la mitophagie dans des sous-types de cancers spécifiques est un facteur décisif pour provoquer une résistance au traitement par clairance mitochondriale.

Concernant le cancer du sein, Plusieurs études suggèrent que l'inhibition de la mitophagie pourrait jouer un rôle essentiel dans la prévention de l'incidence du cancer (Yifeng Liu et al. 2017; Hui-juan Liu et al. 2017). Il a été démontré que le flavonoïde TL-2-8 pouvait prévenir le cancer du sein en bloquant la mitophagie. Ainsi, TL-2-8 en bloquant la fusion du mitophagosome avec le lysosome améliorait la survie des souris porteuses de xénogreffes de cancer du sein (Hui-juan Liu et al. 2017). La fructose-1, 6-bisphosphatase (FBP1), une enzyme limitant la vitesse de la glyconéogénèse, est généralement considérée comme un suppresseur du cancer du sein. Il a été démontré que FBP1 induisait l'apoptose des cellules cancéreuses de sein humaines en inhibant la mitophagie médiée par HIF-1 α / BNIP3 (Yifeng Liu et al. 2017). Il est intéressant de noter qu'une combinaison de DOX et de liensinine augmente l'effet anti-cancéreux de la DOX. Ceci est basé sur l'observation que l'apoptose médiée par la DOX pourrait être favorisée par la liensinine, qui inhibe la mitophagie en empêchant la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Zhou et al. 2015). Il a également été démontré que TAT-ODD-p53, une protéine de fusion p53, stimule l'effet radio-sensibilisant sur des cellules

cancéreuses du sein en hypoxie en inhibant la mitophagie médiée par Parkin (Zheng et al. 2015). La p53 interagit avec Parkin pour inhiber son transfert vers les mitochondries, réduisant ainsi l'effet protecteur de la mitophagie. L'ensemble de ces études montre le rôle inducteur de la mitophagie dans la chimiorésistance associée au cancer de sein.

Chapitre 4 ; La Cardiolipine (CL) dans le cancer



International Journal of
Molecular Sciences



Review

Cardiolipin, the Mitochondrial Signature Lipid: Implication in Cancer

Seyedeh Tayebbeh Ahmadpour, Karine Mahéo, Stéphane Servais , Lucie Brisson and Jean-François Dumas *

Université de Tours, Inserm, Nutrition, Croissance et Cancer UMR1069, 37032 Tours, France; seyedeh.tayebbeh.ahmadpour@etu.univ-tours.fr (S.T.A.); karine.maheo@univ-tours.fr (K.M.); stephane.servais@univ-tours.fr (S.S.); lucie.brisson@univ-tours.fr (L.B.)

* Correspondence: jean-francois.dumas@univ-tours.fr

Received: 29 September 2020; Accepted: 26 October 2020; Published: 28 October 2020



Abstract: Cardiolipins (CLs) are specific phospholipids of the mitochondria composing about 20% of the inner mitochondria membrane (IMM) phospholipid mass. Dysregulation of CL metabolism has been observed in several types of cancer. In most cases, the evidence for a role for CL in cancer is merely correlative, suggestive, ambiguous, and cancer-type dependent. In addition, CLs could play a pivotal role in several mitochondrial functions/parameters such as bioenergetics, dynamics, mitophagy, and apoptosis, which are involved in key steps of cancer aggressiveness (i.e., migration/invasion and resistance to treatment). Therefore, this review focuses on studies suggesting that changes in CL content and/or composition, as well as CL metabolism enzyme levels, may be linked with the progression and the aggressiveness of some types of cancer. Finally, we also introduce the main mitochondrial function in which CL could play a pivotal role with a special focus on its implication in cancer development and therapy.

Keywords: cardiolipin; cancer; mitochondria

Introduction

It has long been thought that cancer cells do not produce energy by mitochondrial oxidative phosphorylation but through a high glycolytic rate coupled with lactic acid production even in presence of oxygen namely the Warburg effect (or aerobic glycolysis) [1]. This reprogramming of metabolism that favors macromolecule biosynthesis, affects tumor microenvironment, and confers direct signaling functions to tumor cells resulting in tumor growth has been documented for over 90 years. However, it is still debated [2]. Contrary to the initial proposition [1], it is now recognized that mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) is not dysfunctional in all cancer cells and participates in ATP production [3]. More generally, through its important contribution to the production of ATP, macromolecules, apoptosis, and oxidative stress, it is now well accepted that mitochondria are involved in key steps of cancer aggressiveness, sustaining tumor growth and cancer progression [2,4,5].

Mitochondrial membranes are made up of different phospholipids: Phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylserine, phosphatidic acid, and cardiolipins [6]. Cardiolipins (CLs) are specific phospholipids of the mitochondria comprising about 20% of the inner mitochondria membrane (IMM) phospholipids mass [6]. Each CL possesses a glycerol head group bound to two phosphatidyl moieties, forming an anionic polar head group. The presence of four esterified fatty acyl chains bound to the glycerol head group forms a cone-shaped structure [7] (**Figure 21**). CL molecular species differ across organisms and tissues and a specific remodeling of CL's acyl chain is observed in several pathologies. CLs interact with IMM proteins and enzymes that are involved in the mitochondrial electron transfer chain (ETC) and the oxidative phosphorylation system (OXPHOS), ensuring the mitochondrial cristae organization, and are therefore indispensable for numerous mitochondrial bioenergetic processes [8–11]. In addition, CLs ensure mitochondrial quality control through the regulation of mitochondrial autophagy (mitophagy) [12]. Moreover, because of the presence of unsaturated fatty acyl chains, CLs are sensitive to oxidative stress. Oxidation of its fatty acyl chain could provide cell death signals and control mitochondrial apoptosis [13]. In fact, the balance between the saturated and unsaturated fatty acyl chain is critical for regulating cellular apoptosis, in particular, in response to therapeutic drugs. Dysregulation of CL metabolism has been observed in several types of cancer and, thus, proposed as a potential therapeutic target. In this review, we describe the main mitochondrial functions in which CLs play a pivotal role. We also discuss different types of cancer in which CLs or CL metabolism enzymes are found to be dysregulated and, thus, could be involved in the development of the disease.

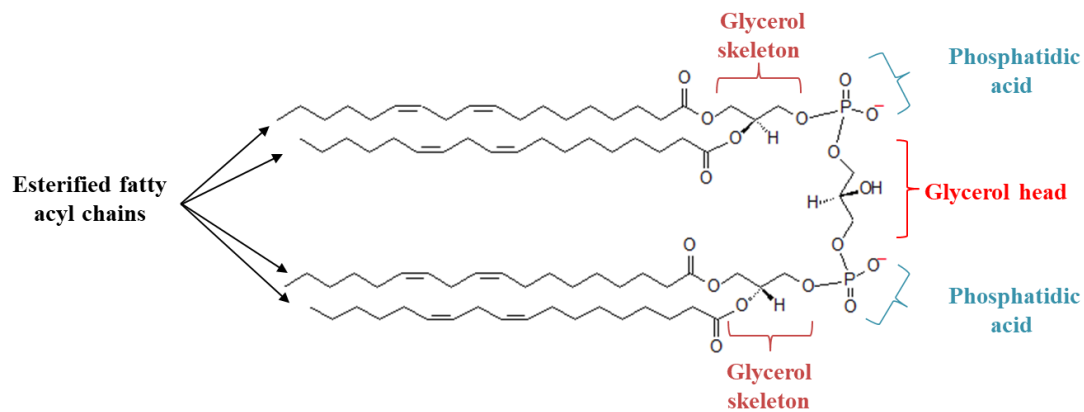


Figure 21. Structure of cardiolipin (CL). Each CL possesses a glycerol head group bound to two phosphatidyl moieties, forming an anionic polar head group. The presence of four esterified fatty acyl chains bound to the glycerol head group forms a cone-shaped structure.

1. Cardiolipin Metabolism

CL metabolism is divided into two main steps (**Figure 22**). The first step consists of its biosynthesis. It is initiated upon the formation of phosphatidic acid (PA), which takes place in the outer mitochondrial membrane (OMM) and is then transferred into the inner mitochondrial membrane (IMM). Once in the IMM, the conversion of PA into CDP-diacylglycerol (CDP-DG) is effected by a CDP-DG synthase protein also known as Tamm41 protein [14]. CDP-DG is then converted to phosphatidylglycerol phosphate (PGP) by the phosphatidyl glycerophosphate synthase 1 (Pgs1) enzyme which catalyzes the transfer of a phosphatidyl group to the glycerol-3-phosphate (G3P) [15]. This pathway is then pursued by the phosphatidyl glycerophosphate phosphatase 1 (PGPP1) enzyme to form phosphatidylglycerol (PG) [16]. Finally, CL synthase 1 (CRLS1) catalyzes the formation of immature CL by using CDP-DG and PG [17]. Immature CLs are characterized by saturated acyl chains of variable length and asymmetry around the glycerol head group [18,19]. CL biosynthesis is then followed by structural modifications called remodeling. This step starts by removing an acyl chain via the activity of a phospholipase to form monolyso-CL (MLCL). The MLCL is then reacylated by an acyl transferase to form mature CL. Three enzymatic pathways are involved in CL remodeling. Tafazzin is a transacylase localized on the outer face of the IMM and transfers an acyl chain of phosphatidylethanolamine (PE) and/or phosphatidylcholine (PC) to MLCL, allowing the formation of a fully mature form of CL [20,21]. The acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase (ALCAT1) and MLCL acyltransferase 1 (MLCLAT1) are two other acyltransferases that reside, respectively, on the endoplasmic reticulum mitochondria-associated membranes (ER MAM) and inner leaflet of the IMM. Both ALCAT1 and MLCLAT1 use the acyl chain of acyl-CoAs to ensure MLCL reacylation [22,23]. Moreover, studies show the involvement of mitochondrial protein complexes and supercomplexes in the remodeling process [24,25].

Among the mitochondrial protein complexes, three main groups are known to be involved: Prohibitins [26], the mitochondrial contact site, and the cristae organizing system (MICOS) complex [27,28] and the OXPHOS complexes [29–31]. Mature CLs that are characterized by symmetric incorporation of unsaturated longer fatty acyl chains are then assembled into mitochondrial protein complexes, allowing supercomplexes' formation and assembly [19,32]. This interaction with mitochondrial protein complexes and supercomplexes protects CL from degradation and confers a long half-life to CL [33].

Dysregulation in biosynthesis and remodeling of CL impair proper mitochondrial function. Therefore, abnormalities in CL metabolism can be associated with pathophysiological conditions including cancer. Several studies showed changes in CL content and/or composition in tumor tissues or cancer cells. In human prostate cancer tissues, changes in the quantity of various lipids including CL were observed, and CL content was found to be increased in the regions with high tumor cell density [34]. In addition, a modification of CL composition has been observed in tumor prostate tissue of patients [34]. Thus, in tumor tissue, CL composition in palmitoleic acid (C16:1) was increased compared with non-tumor tissue. Increasing the CL content in palmitoleic acid was positively correlated with the proliferation of PC-3 cells. Furthermore, a diet rich in oleic acid (C18:1) decreases PC-3 cell proliferation by changing the fatty acid composition of CL [35]. High CL quantity and alteration of acyl chain composition are also observed in thyroid oncotic tumors and are considered to be a tumor biomarker [36]. However, a direct correlation between higher CL content and cancer aggressiveness does not seem to be true in all types of cancer. For instance, in human tumor tissues of hepatocellular carcinoma (HCC), CL content was found to be gradually decreased during HCC progression compared to peripheral non-cancerous tissues, accompanied by a concomitant decrease of oxidized CL [13]. Additionally, CL species of tetralinoleoyl CL (TLCL) decrease in three liver cancer cell lines (Huh7, HepG2, LM3) while the level of saturated and monounsaturated CL is increased compared to non-cancer cells [13]. All those observations give rise to the idea that CL acyl chains are more important than CL content and could play a key role in the control of cancer aggressiveness. In fact, a decrease in the polyunsaturated fatty acyl chain can decrease CL fatty acyl oxidation, which may disrupt apoptotic response. However, how CL fatty acyl chains control tumor cell proliferation remains unclear.

The study of CL metabolism proposes a tumor suppressor implication of the CL biosynthesis gene, CRLS1. Thus, in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), a positive correlation between high CRLS1 mRNA expression and their overall survival was described [37]. CRLS1 was co-expressed with PPM1A and PTPRR, genes that are involved in the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway [37]. PPM1A is a phosphatase

involved in tumor suppression via dephosphorylation of MAPKs, P38, and JNK [38,39]. Similarly, the tumor suppressor function of PTPRR in a cervical cancer model has been suggested [40]. More studies also propose the tumor suppressor activity of CRLS1 in HCC. It has been found that LINC00961, a novel long non-coding RNA which has been uncovered as a tumor suppressor in lung cancer and glioma, was downregulated in HCC tissues and cell lines (HepG2 and Hep3B) [41]. Mechanistically, in HepG2 and Hep3B HCC cell lines, overexpression of long non-coding RNA LINC00961 was proportionally correlated with CRLS1 mRNA and protein overexpression, resulting in the inhibition of HCC progression (i.e., inhibition of cell proliferation, migration, and invasion in HCC cells). Both LINC00961 and CRLS1 protein expression were downregulated in patients' HCC tumors [41]. These studies suggest a tumor suppressor function for CRLS1 that is co-expressed with other tumor suppressor proteins. However, how this CL metabolism enzyme could impact CL metabolism along with its tumor suppressor function and the downstream pathways leading to the inhibition of tumor growth is not clearly understood. CRLS1 is not the only CL metabolism enzyme that could be involved in cancer. Contrary to CRLS1, studies propose a tumorigenesis function for CL remodeling enzyme, tafazzin. The level of tafazzin protein expression was found to be increased in squamous cervical carcinoma compared to normal cervical tissue [42]. In cervical cancer cells, overexpression of tafazzin significantly increased cell growth and viability. Moreover, tafazzin silencing increased apoptosis in cervical cancer cells, suggesting an inhibitor role on apoptosis for tafazzin [42]. It seems that tafazzin controls mitochondrial apoptotic pathways as its knockdown increases the cleavage of caspase 9 and caspase 3, the two proteins involved in the intrinsic apoptotic pathway. In addition, the tumorigenesis role of tafazzin has been proposed in rectal cancer and thyroid cancer where tafazzin expression was related to cancer development and its suppression has led to thyroid cancer apoptosis [43,44].

As a phospholipid signature of mitochondria, CL has a key role in the stability and integrity of mitochondrial structure and function. There is growing evidence that reprogramming of CL metabolism exists in cancer. However, whether and how CL (via resistance to anti-tumor drugs, tumor growth, and metastasis) really influences cancer needs to be determined. Indeed, in most cases, the evidence for a role for CL in cancer is merely correlative, suggestive, ambiguous, and cancer-type dependent. In addition, although some enzymes of CL biosynthesis and remodeling were found to be involved in the control of cancer inhibition/development, no information on CL content and composition was found. Therefore, it seems that CL diversity and the expression levels of individual CL metabolism enzymes are not significantly linked.

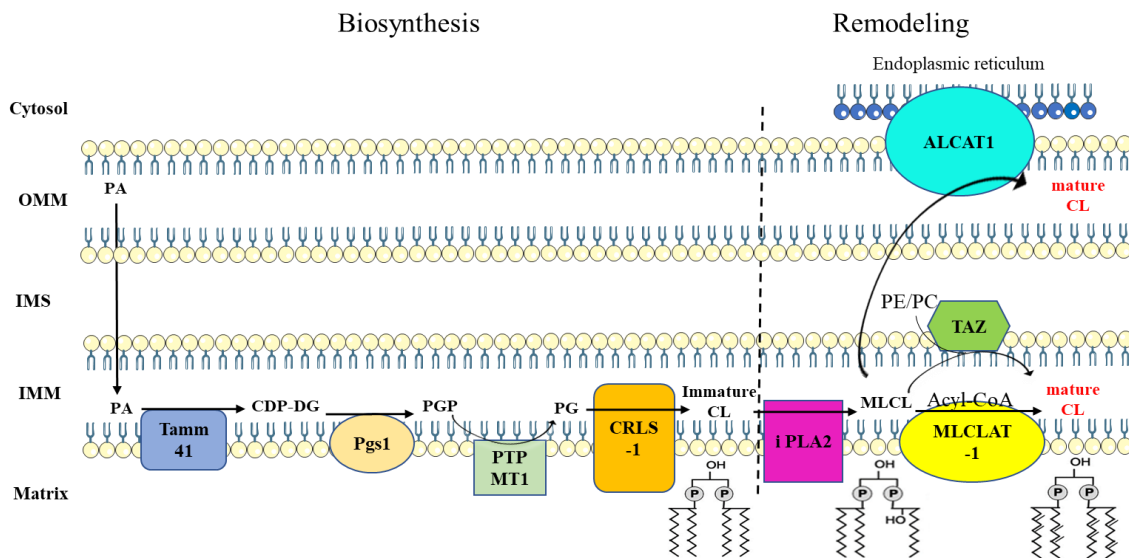


Figure 22. Cardiolipin metabolism is a two-step process. Biosynthesis step results in the formation of immature CL with acyl chain composition that is not yet definitive. Fatty acyl chain of immature CL undergoes several modifications through the activity of remodeling proteins, leading to the formation of mature CL. Abbreviations: PA, phosphatidic acid; Tamm41 (CDP-DS), CDP diacylglycerol synthase; CDP-DG, cytidine diphosphate-diacylglycerol; Pgs1, phosphatidylglycerophosphate synthase 1; PGP, phosphatidylglycerol phosphate; PTPMT1 (PGPP), phosphatidylglycerophosphate phosphatase 1; PG, phosphatidylglycerol; CRLS1, cardiolipin synthase 1; CL, cardiolipin; PLA2, phospholipase A2; MLCL, monolysocardiolipin; MLCLAT1, monolysocardiolipin acyltransferase 1; TAZ, tafazzin; ALCAT1, acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase; OMM, outer mitochondrial membrane; IMM, inner mitochondrial membrane; IMS, intermembrane space; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine.

2. Role of CL in Metabolic Reprogramming

In mitochondria, energy is produced through the OXPHOS process [45]. The four complexes (I–IV) of the respiratory chain catalyze the electron transport from reduced equivalents (nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and flavin adenine dinucleotide (FADH₂)) to the oxygen molecule and create a transmembrane proton gradient. This gradient provides an energy source to produce ATP by complex V (ATP synthase). Metabolic reprogramming in most of the cases supports tumor growth, favors cancer invasion and metastasis and response to therapy, and is now recognized as one of the hallmarks of cancer [46]. It is now clear that this metabolic plasticity requires fully functional mitochondria and finely-tuned regulations of their activity.

CL interacts with protein complexes of the ETC and OXPHOS and enables their structural integrity and proper enzymatic activity. Mitochondria with impaired CL biosynthesis have an altered cristae structure and the assembly of the ETC supercomplex is decreased [10,11]. The presence of CL-specific binding sites has been detected in complexes I, III, and

IV [10,47]. ETC protein complexes are organized into the higher organized structures known as supercomplexes or « respirasome » in order to improve the electron transfer efficiency [48,49]. The association of individual complexes into supercomplexes requires the interaction with CL to be established [50,51]. The effect of CL remodeling and quantity on mitochondrial bioenergetics has been proposed in cancer-related cachexia, which is driven by a reduced food intake with increased energy expenditure, excess catabolism, and inflammation, and leads to treatment-related complication, poor quality of life, and cancer-related mortality [52]. In urothelial-carcinoma-related cachexia, mitochondrial phospholipid remodeling including CL was associated with lower respiratory chain activity and higher expression of mitochondrial UCP3 in skeletal muscle, resulting in a decrease in ATP production [53]. Moreover, in a rat model of cancer cachexia induced by peritoneal carcinosis, higher CL content and acyl chain modification has been observed in liver mitochondria and was accompanied by lower efficiency of oxidative phosphorylation and an increase in energy wasting [54]. Functionally, enrichment of CL content in the Hepa-RG hepatocyte-like cells leads to an increase in mitochondrial oxygen consumption with higher energy wasting [55]. Whether CL can play a direct role in cancer cachexia by modulating metabolism needs to be studied further.

On the other hand, a decrease in CL content and modification of CL molecular species has been observed in the mitochondria from CT-2A (malignant anaplastic astrocytoma) and EPEN (ependymoblastoma) brain tumors compared with the mitochondria isolated from B6 mouse brain [56]. Moreover, in the VM-NM1 (a rapidly growing nonmetastatic tumor) and VM-M2 (highly invasive tumor) brain tumors, CL content was lower than in the control VM mouse brain, and its acyl chain composition was modified in all VM-NM1, VM-NM2, and VM-NM3 (invasive tumor) brain tumors. In all mentioned mouse brain tumor types, the activity of mitochondrial respiratory chain complexes I and II, as well as overall activity of mitochondrial ETC, was decreased [56]. In addition, in C6 glioma cells, tafazzin knock-down in the presence of linoleic acid reduced the capacity of oxidative phosphorylation [57], mitochondrial complex I function, and increased glycolytic activity [58]. All those changes were accompanied by a dramatic reduction in cell proliferation [57,58]. It has already been demonstrated that the decrease in CL content affects the assembly of the ETC supercomplex [10]. Moreover, complex I assembly into supercomplexes can regulate mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production [59]. Therefore, it could be hypothesized that the alteration in the ETC supercomplex assembly increases the production of ROS, which will regulate subsequent signaling pathways such as cell proliferation and apoptosis.

CL also seems required for acetyl CoA synthesis and is essential for the normal function of the tricarboxylic acid (TCA) cycle [60,61]. In this line, the CL-deficient model of a mouse

C2C12 myoblast cell line has shown a decreased carbon flux from glucose to acetyl CoA associated with a decrease in pyruvate dehydrogenase activity [60]. Moreover, the implication of acetyl CoA in cancer cell migration and metastasis has already been demonstrated [62–66]. For instance, studies show that high levels of acetyl CoA could increase the acetylation and activation of the Smad2 transcription factor, resulting in epithelial-mesenchymal transition and induction of metastasis in breast cancer cell lines [62]. Additionally, in pancreatic ductal adenocarcinoma, increases in the acetyl CoA level favor cell proliferation through histone acetylation [65,66]. These studies suggest a link between CL, TCA cycle function, and energy metabolism, which consequently influence tumor cell proliferation and metastasis.

Because of its crucial role in the assembly of the mitochondrial protein complexes and supercomplexes, it is conceivable that any alteration in CL metabolism could influence respiratory chain activity and efficiency of oxidative phosphorylation and in turn metabolic reprogramming in cancer or cancer cachexia. However, more studies are required to reveal the fundamental mechanism through which CL, by modulating metabolism, may influence cancer aggressiveness (i.e., migration/invasion and resistance to treatment). In addition, mitochondrial fatty acid oxidation is another strategy used by cancer cells to promote proliferation, drug resistance, and metastatic progression [67]. Interestingly, both fatty acid oxidation and CL remodeling required a monolysocardiolipin acyltransferase-like enzyme, hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha (HADHA) (tri-functional protein alpha), to ensure proper mitochondria function in human cardiomyocytes [68]. However, their direct interplay in cancer is not fully elucidated.

3. Role of CL in Mitochondrial Quality Control

The proper function of mitochondria requires the maintaining of their proper architecture that is ensured by the mitochondrial quality control mechanism. This mechanism is under the control of two main processes, mitochondrial dynamics and mitophagy. Mitochondrial dynamics regulate the quality control mechanism through mitochondrial fusion and fission processes [69]. Mitochondria fusion allows two mitochondria to merge into one single mitochondrion. This process is initiated by the activation of dynamin-related GTPases, mitofusin (Mfn-1 and Mfn-2) and optic atrophy (OPA-1), allowing the fusion of OMM and IMM, respectively [70,71]. Even if the exact underlying mechanisms are still being studied, it has been proposed that mitochondrial fusion could play a role in resistance to therapy. In fact, increased mitochondrial fusion was found to be associated with cisplatin-resistance of cervical and ovarian cancer cell lines [72]. This finding suggests that fused mitochondria may have better ETC and OXPHOS protein activity and, thus, a better ATP production which may be

responsible for cell survival and resistance. During fission, one mitochondrion undergoes the division into daughter mitochondria via the activity of dynamin-related protein 1 (DRP1) [71]. DRP1 recruitment to the OMM leads to the formation of a ring-like structure around mitochondria followed by mitochondria division [73]. Although mitochondrial fission is required to ensure mitochondrial dynamics, it may intensify cancer aggressiveness. For example, it has been found that invasive breast carcinoma cell lines have fragmented mitochondria and a higher DRP1 level than a non-metastatic cell line. Moreover, DRP1 silencing was associated with decreased migration and invasion [74]. In addition, in a glioblastoma cell line, the expression of DRP1 and mitochondria fission was increased in the hypoxic condition associated with higher migration and invasion. Treatment with DRP1 inhibitor (M-DIVI-1) decreased hypoxia-induced migration [75]. CL is critical for the mitochondrial fusion process by ensuring the OPA-1 biogenesis and assembly [76]. Interaction of CL with Opa1 stimulates GTPase activity of this protein, ensuring mitochondrial fusion [77–79]. Studies suggest that mitochondrial fusion can be influenced by CL content and composition. An in vitro membrane fusion reaction has been performed, showing that the incubation of CL-containing liposomes with purified human OPA-1 protein promotes membrane fusion, while no effect was observed with low concentrations of CL. Furthermore, the increase in the unsaturated acyl chain of CL could improve this process [76]. CL interaction with DRP1 seems to be crucial in promoting mitochondrial fission [80,81]. In fact, it has been shown that DRP1 interacts preferentially with membranes containing CL compared to membranes containing other anionic lipids. Moreover, the interaction of DRP1 with CL has been found to be essential to stimulate its GTPase activity [80].

In the damaged mitochondrion, the impaired daughter mitochondria produced by the fission mechanism can be further eliminated by mitochondrial-specific autophagy known as mitophagy. Mitophagy is a process by which damaged and dysfunctional mitochondria are selectively degraded via autophagy [82]. In stress conditions such as mitochondrial membrane depolarization, hypoxia, or nutrient deprivation, activation of mitophagy maintains mitochondrial integrity and function [83]. Inversely, defective mitophagy can lead to the development of diseases including cancer. Indeed, tumor suppressor activity of mitophagy has already been demonstrated in numerous types of cancers [84–89]. However, depending on the stages of tumor development, mitophagy may also be involved in tumorigenesis by promoting tumor cell survival and metastasis [90–93]. CL is known to be involved in the modulation of mitophagy in order to regulate the mitochondrial quality control process (

Figure 23). In the damaged mitochondria, CL migrates from the IMM to the OMM via nucleoside diphosphate kinase D (NDPK-D) [12,94]. Externalized CLs specifically interact with light chain 3 (LC3) protein which allows the recognition of injured mitochondria and initiates the formation of autophagolysosome [12]. Moreover, CL peroxidation allows for the translocation of oxidized CL to the OMM. Oxidized CL on the OMM can be recognized by a LC3 subfamily, LC3A, which may prevent CL recognition by apoptotic machinery [95]. Downregulation of CL biosynthesis, preventing CL localization at the OMM, and blocking the LC3–CL interaction, inhibits LC3-dependent mitophagy [96]. In addition, modification of CL composition, mainly a decrease in TLCL, results in the accumulation of dysfunctional and damaged mitochondria [12,97]. CL on the OMM can directly interact with beclin 1 in order to induce mitophagy [98]. The role played by mitophagy via CL in cancer is understudied. In chronic myeloid leukemia (CML), CL interacts with the PH-domain of p210 BCR-ABL protein (a common variant causing CML). This interaction allows for the translocation of p210 BCR-ABL protein from the cytosol to the mitochondria and promotes mitochondrial damage. Damaged mitochondria can further be eliminated via mitophagy [99].

It seems important to maintain a balance of fusion and fission as mitochondrial fusion could be associated with therapy resistance of cancer cells [72], and mitochondrial fission seems to be rather involved in cancer invasion [74,75]. Interaction of CL with fusion and fission mitochondrial proteins has been studied. However, little is known about the implication of CLs in fusion and fission mechanisms that are related to the resistance and invasion in cancer cells. Similarly, despite its implication in the activation of mitophagy, there are not enough data about whether the interaction of CLs with mitophagy actors could be implicated in cancer disease and how CL-dependent mitophagy is modified at different stages of cancer development. Therefore, to clearly understand how CL could be involved in mitochondrial dynamics/mitophagy related abnormalities, more investigations are required.

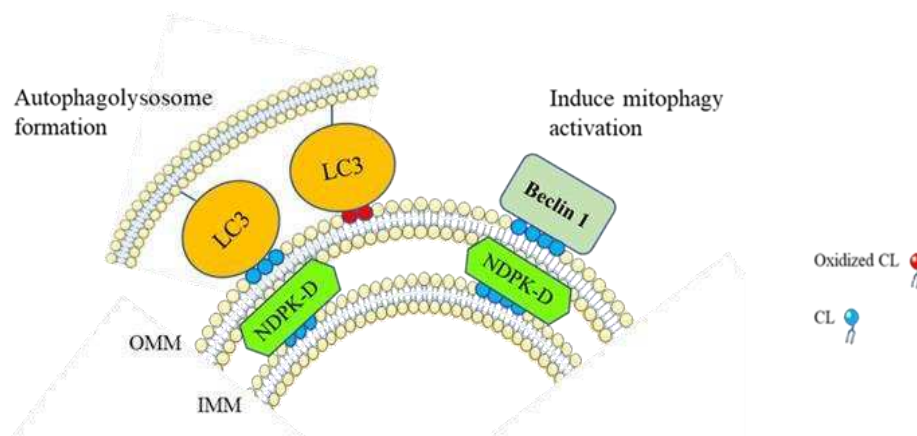


Figure 23. Cardiolipin translocation to the outer mitochondrial membrane (OMM) induces mitophagy. In damaged mitochondria, translocation of CL to the OMM is performed via nucleoside diphosphate kinase D (NDPK-D) activity [94]. CL on the OMM interacts with the cytosolic mitophagic protein LC3 which is responsible for autophagolysosome formation [12] and beclin 1, leading to the activation of other mitophagic actors [98]. Moreover, oxidized CL can be dissociated from cytochrome c and therefore translocated to the OMM, where their interaction with LC3 initiates the formation of autophagolysosome [95].

4. Role of CL in Apoptosis

Mitochondria play a pivotal role in the accomplishment of apoptotic signals [100,101]. Permeabilization of the OMM leads to the release of apoptotic factors from the mitochondria to the cytosol and induces apoptosis [100,102,103]. It has been found that permeabilization of mitochondrial OMM is tightly regulated by the proteins from the Bcl-2 family. A possible CL-dependent apoptotic pathway is mediated through caspase-8/tBID cooperation [104]. During this pathway, activation of caspase-8 leads to cleavage of BH3 interacting domain death agonist (BID), producing an active carboxyl fragment (tBID) which is translocated to the mitochondria and, by cooperation with BAX protein, promotes permeabilization of mitochondrial membrane and cytochrome C (cytC) release [104–106]. It has been suggested that CL provides an activating platform for caspase-8 translocation on mitochondria and thereby seems necessary for integral activation of caspase-8 and efficient apoptotic response [107,108]. Moreover, studies suggested that CLs are involved in the transduction of apoptotic signals by interacting with tBID protein [109] (**Figure 24**). Interaction of CL with tBID leads to the modification of the mitochondrial structure. This modification allows for the oligomerization of Bax/Bak

through the BH3 domain of tBID, resulting in the disruption of the mitochondrion [110]. Moreover, tBID/CL interaction by remodeling the cristae structure can promote the cytC release to the cytosol which in turn activates caspase 9 and initiates apoptosis [111,112].

Through their electrostatic interaction with cytC, CLs ensure electron transfer in the ETC [113]. This interaction seems thus indispensable for the OXPHOS process [114]. In addition, the unsaturated acyl chain of CL can interact through a hydrophobic interaction with cytC [113]. This hydrophobic interaction between CL/cytC confers a peroxidase activity to cytC, resulting in the oxidation of the CL acyl chain [115]. During apoptosis, oxidized CL has a very low affinity with cytC, leading to detachment of cytC from the complex and its release to the cytosol [116,117]. The impact of CL-cytC complexes in apoptosis has been studied in ovarian cancer cells. In the doxorubicin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells (A2780 and A2780-ADR, respectively), treatment with cytC-CL nano-complexes have induced apoptosis while a free form of cytC was not sufficient to promote cell death. CL-cytC complex-induced cell death was due to a lipoperoxidase reaction achieved by CL-coupled cytC [118]. In HCC, CL was significantly decreased in human tumor tissues compared with the non-tumor area, accompanied by a decrease in oxidized CL level. CL profiles of Huh7 and HepG2 HCC cell lines revealed a decrease in the TLCL CL species level with an increase in saturated and monounsaturated CL compared to non-cancer cells. The increase in CL content with a high level of TLCL species intensifies the production of CL oxidation products increasing apoptotic sensitivity in response to the sorafenib [13]. More studies on Huh7 cell lines have shown that under lysosomal stress, CL content was decreased, leading to mitochondrial fission. Mitochondrial fission was accompanied by an impaired mitochondrial function associated with mitochondria-induced apoptosis [119]. CLs also have a high affinity with the anticancer drug doxorubicin (Dox). Thereby, the CL–Dox interaction can allow for the internalization of Dox into mitochondria, leading to cell toxicity and death. In this line, studies on Barth syndrome (X-linked recessive disease caused by a mutation in the tafazzin gene) showed that the B-lymphocytes of Barth syndrome patients are less sensitive to Dox-induced oxidative stress, while CL content is decreased [120].

Due to its fatty acid composition, CL is subject to chemical modification and oxidation. Moreover, its specific interaction with cytochrome C and likely with some Bcl-2 family members makes CL pivotal in regulating mitochondrial apoptosis. Modification of CL content and acyl chain composition may directly impact apoptosis in cancer cells [13]. It can be hypothesized that lower CL content, by decreasing OMM permeabilization, inhibits apoptosis signal transmission. Additionally, a decrease in unsaturated fatty acyl content by reducing CL peroxidation could reduce apoptosis [13]. However, the real role played by CL-related

apoptosis and the underlying mechanism by which cancer cells modify their CL content/composition remains unclear and requires more revealing studies.

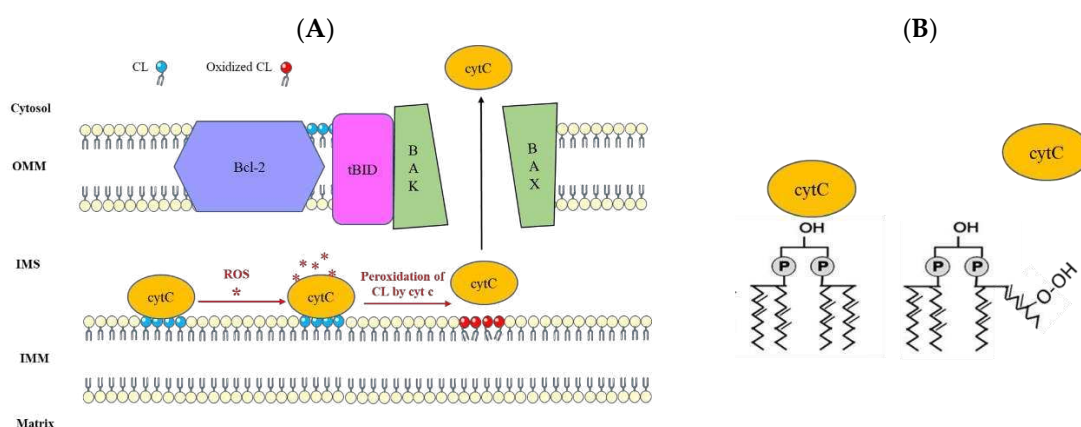


Figure 24. (A) Cardiolipin-mediated apoptotic pathway via Bcl-2 family proteins interaction and cytochrome c release. Production of reactive oxygen species (ROS) under stress signals confer a peroxidase activity to cytochrome c (cytC). Oxidation of CL via cytC results in dissociation of cytC-CL complex, leading to cytC release to the cytosol [116,117]. Moreover, the interaction of CL with tBID allows the oligomerization of Bax/Bak, resulting in mitochondria disruption and cytC release to the cytosol, which will activate the caspase signaling pathway and initiate apoptosis [104–106]. **(B) Schematic representation of CL peroxidation which leads to dissociation of CL-cytC complex.**

Conclusion

CL could play a pivotal role in several mitochondrial functions/parameters such as bioenergetics, dynamics, mitophagy, and apoptosis, which are involved in key steps of cancer aggressiveness (i.e., migration/invasion and resistance to treatment). In addition, several studies suggest that CL metabolism reprogramming occurs in cancer cells. A better understanding of why the CL profile is different in cancer cells and how CL controls tumor metastasis and drug resistance may not only be instrumental for the clinical relevance of studying CL metabolism, but also for the development of innovative therapeutic approaches for cancer.

Abbreviations

ADR: Adriamycin

ALCAT1: Acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase

ATP: Adenosine triphosphate

BAK: Bcl-2 antagonist or killer

BAX: Bcl-2 associated X protein

Bcl-2: B-cell lymphoma-2

BID: BH3 interacting domain death agonist
 CDP-DG: Cytidine diphosphate diacylglycerol
 CL: Cardiolipin
 CML: Chronic myeloid leukemia
 CRLS1: Cardiolipin synthase 1
 CytC: Cytochrome C
 DOX: Doxorubicin
 DRP1: Dynamin-related protein 1
 ETC: Electron transfer chain
 ER: Endoplasmic reticulum
 FADH2: Flavin adenine dinucleotide (reduced)
 G3P: Glycerol-3 phosphate
 HADHA: Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha
 HCC: Hepatocellular carcinoma
 IMM: Inner mitochondria membrane
 JNK: c-Jun N-terminal kinase
 LC3: Light chain 3 protein
 MAM: Mitochondria-associated membrane
 MAPK: Mitogen-activated protein kinases
 Mfn: Mitofusin protein
 MICOS: Mitochondrial contact site and cristae organizing system
 MLCL: Monolyso-cardiolipin
 MLCLAT1: Monolyso-cardiolipin acyl transferase 1
 NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)
 NDPK-D: Nucleoside diphosphate kinase D
 NSCLC: Non-small cell lung cancer
 OMM: Outer mitochondria membrane
 OPA-1: Optic atrophy-1
 OXPHOS: Oxidative phosphorylation system
 P38: P38 Mitogen-activated protein kinases signaling pathway
 PA: Phosphatidic acid
 PC: Phosphatidyl choline
 PE: Phosphatidyl ethanolamine
 PG: Phosphatidyl glycerol
 PGP: Phosphatidyl glycerol phosphate

PGPP1: Phosphatidyl glycerophosphate phosphatase 1

Pgs1: Phosphatidyl glycerophosphate synthase 1

PPM1A: Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent 1A

PTPRR: Protein tyrosine phosphatase receptor type R

TCA cycle: Tricarboxylic acid cycle

UCP3: Mitochondrial uncoupling protein 3

Author Contributions: S.T.A. and J.-F.D. proposed the main conceptual idea. S.T.A. did the overall write-up of the survey. K.M., S.S., L.B., and J.-F.D. helped with the structure and the overall editing of the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partly supported by the “Ligue Nationale Contre le Cancer” (comités 37, 53, 85), by the “Canceropole Grand Ouest” (CONCERTO, régions Centre-Val de Loire, Pays de Loire et Bretagne) and by the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer”. S.T.A. was supported by “Université de Tours”.

Acknowledgments: The authors thank Helene Tison for helpful proofreading.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* **1956**, *123*, 309–314.
2. Liberti, M.V.; Locasale, J.W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 211–218.
3. Moreno-Sánchez, R.; Rodríguez-Enríquez, S.; Marín-Hernández, A.; Saavedra, E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* **2007**, *274*, 1393–1418.
4. Behrend, L.; Henderson, G.; Zwacka, R.M. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31 Pt 6*, 1441–1444.
5. Ott, M.; Gogvadze, V.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **2007**, *12*, 913–922.
6. Horvath, S.E.; Daum, G. Lipids of mitochondria. *Prog. Lipid Res.* **2013**, *52*, 590–614.
7. Schlame, M. Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 1607–1620.
8. Ren, M.; Phoon, C.K.L.; Schlame, M. Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* **2014**, *55*, 1–16.
9. Claypool, S.M.; Koehler, C.M. The complexity of cardiolipin in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* **2012**, *37*, 32–41.

10. Musatov, A.; Sedláč, E. Role of cardiolipin in stability of integral membrane proteins. *Biochimie* **2017**, *142*, 102–111.
11. Ikon, N.; Ryan, R.O. Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2017**, *1859*, 1156–1163.
12. Chu, C.T.; Ji, J.; Dagda, R.K.; Jiang, J.F.; Tyurina, Y.Y.; Kapralov, A.A.; Tyurin, V.A.; Yanamala, N.; Shrivastava, I.H.; Mohammadyani, D.; et al. Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 1197–1205.
13. Zhong, H.; Xiao, M.; Zarkovic, K.; Zhu, M.; Sa, R.; Lu, J.; Tao, Y.; Chen, Q.; Xia, L.; Cheng, S.; et al. Mitochondrial control of apoptosis through modulation of cardiolipin oxidation in hepatocellular carcinoma: A novel link between oxidative stress and cancer. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *102*, 67–76.
14. Tamura, Y.; Harada, Y.; Nishikawa, S.; Yamano, K.; Kamiya, M.; Shiota, T.; Kuroda, T.; Kuge, O.; Sesaki, H.; Imai, K.; et al. Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria. *Cell Metab.* **2013**, *17*, 709–718.
15. Chang, S.C.; Heacock, P.N.; Clancey, C.J.; Dowhan, W. The PEL1 gene (renamed PGS1) encodes the phosphatidylglycero-phosphate synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 9829–9836.
16. Zhang, J.; Guan, Z.; Murphy, A.N.; Wiley, S.E.; Perkins, G.A.; Worby, C.A.; Engel, J.L.; Heacock, P.; Nguyen, O.K.; Wang, J.H.; et al. Mitochondrial phosphatase PTPMT1 is essential for cardiolipin biosynthesis. *Cell Metab.* **2011**, *13*, 690–700.
17. Chen, D.; Zhang, X.-Y.; Shi, Y. Identification and functional characterization of hCLS1, a human cardiolipin synthase localized in mitochondria. *Biochem. J.* **2006**, *398*, 169–176.
18. Schlame, M.; Ren, M.; Xu, Y.; Greenberg, M.L.; Haller, I. Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins. *Chem. Phys. Lipids* **2005**, *138*, 38–49.
19. Schlame, M.; Ren, M. Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 5450–5455.
20. Xu, Y.; Sutachan, J.J.; Plesken, H.; Kelley, R.I.; Schlame, M. Characterization of lymphoblast mitochondria from patients with Barth syndrome. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **2005**, *85*, 823–830.
21. Claypool, S.M.; McCaffery, J.M.; Koehler, C.M. Mitochondrial mislocalization and altered assembly of a cluster of Barth syndrome mutant tafazzins. *J. Cell Biol.* **2006**, *174*, 379–390.
22. Lu, Y.-W.; Claypool, S.M. Disorders of phospholipid metabolism: An emerging class of mitochondrial disease due to defects in nuclear genes. *Front. Genet.* **2015**, *6*, 3.

23. Taylor, W.A.; Hatch, G.M. Purification and characterization of monolysocardiolipin acyltransferase from pig liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 12716–12721.
24. Claypool, S.M.; Boontheung, P.; McCaffery, J.M.; Loo, J.A.; Koehler, C.M. The cardiolipin transacylase, tafazzin, associates with two distinct respiratory components providing insight into Barth syndrome. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 5143–5155.
25. Xu, Y.; Malhotra, A.; Claypool, S.M.; Ren, M.; Schlame, M. Tafazzins from *Drosophila* and mammalian cells assemble in large protein complexes with a short half-life. *Mitochondrion* **2015**, *21*, 27–32.
26. Richter-Dennerlein, R.; Korwitz, A.; Haag, M.; Tatsuta, T.; Dargazanli, S.; Baker, M.; Decker, T.; Lamkemeyer, T.; Rugarli, E.I.; Langer, T. DNAJC19, a mitochondrial cochaperone associated with cardiomyopathy, forms a complex with prohibitins to regulate cardiolipin remodeling. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 158–171.
27. Harner, M.E.; Unger, A.-K.; Izawa, T.; Walther, D.M.; Ozbalci, C.; Geimer, S.; Reggiori, F.; Brügger, B.; Mann, M.; Westermann, B.; et al. Aim24 and MICOS modulate respiratory function, tafazzin-related cardiolipin modification and mitochondrial architecture. *eLife* **2014**, *3*, e01684.
28. Koob, S.; Barrera, M.; Anand, R.; Reichert, A.S. The non-glycosylated isoform of MIC26 is a constituent of the mammalian MICOS complex and promotes formation of crista junctions. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1853*, 1551–1563.
29. Pfeiffer, K.; Gohil, V.; Stuart, R.A.; Hunte, C.; Brandt, U.; Greenberg, M.L.; Schägger, H. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 52873–52880.
30. Zhang, M.; Mileykovskaya, E.; Dowhan, W. Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 43553–43556.
31. Claypool, S.M.; Oktay, Y.; Boontheung, P.; Loo, J.A.; Koehler, C.M. Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* **2008**, *182*, 937–950.
32. Houtkooper, R.H.; Turkenburg, M.; Poll-The, B.T.; Karall, D.; Pérez-Cerdá, C.; Morrone, A.; Malvagia, S.; Wanders, R.J.; Kulik, W.; Vaz, F.M. The enigmatic role of tafazzin in cardiolipin metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 2003–2014.
33. Xu, Y.; Phoon, C.K.L.; Berno, B.; D’Souza, K.; Hoedt, E.; Zhang, G.; Neubert, T.A.; Epand, R.M.; Ren, M.; Schlame, M. Loss of protein association causes cardiolipin degradation in Barth syndrome. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 641–647.

34. Randall, E.C.; Zadra, G.; Chetta, P.; Lopez, B.G.C.; Syamala, S.; Basu, S.S.; Agar, J.N.; Loda, M.; Tempany, C.M.; Fennessy, F.M.; et al. Molecular Characterization of Prostate Cancer with Associated Gleason Score Using Mass Spectrometry Imaging. *Mol. Cancer Res. MCR* **2019**, *17*, 1155–1165.
35. Sapandowski, A.; Stope, M.; Evert, K.; Evert, M.; Zimmermann, U.; Peter, D.; Päge, I.; Burchardt, M.; Schild, L. Cardiolipin composition correlates with prostate cancer cell proliferation. *Mol. Cell. Biochem.* **2015**, *410*, 175–185.
36. Zhang, J.; Yu, W.; Ryu, S.W.; Lin, J.; Buentello, G.; Tibshirani, R.; Suliburk, J.; Eberlin, L.S. Cardiolipins Are Biomarkers of Mitochondria-Rich Thyroid Oncocytic Tumors. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 6588–6597.
37. Feng, H.-M.; Zhao, Y.; Zhang, J.-P.; Zhang, J.-H.; Jiang, P.; Li, B.; Wang, C. Expression and potential mechanism of metabolism-related genes and CRLS1 in non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 2661–2668.
38. Zhang, B.; Zhou, Z.; Lin, H.; Lv, X.; Fu, J.; Lin, P.; Zhu, C.; Wang, H. Protein phosphatase 1A (PPM1A) is involved in human cytotrophoblast cell invasion and migration. *Histochem. Cell Biol.* **2009**, *132*, 169–179.
39. Li, R.; Gong, Z.; Pan, C.; Xie, D.-D.; Tang, J.-Y.; Cui, M.; Xu, Y.-F.; Yao, W.; Pang, Q.; Xu, Z.-G.; et al. Metal-dependent protein phosphatase 1A functions as an extracellular signal-regulated kinase phosphatase. *FEBS J.* **2013**, *280*, 2700–2711.
40. Su, P.-H.; Lin, Y.-W.; Huang, R.-L.; Liao, Y.-P.; Lee, H.-Y.; Wang, H.-C.; Chao, T.-K.; Chen, C.-K.; Chan, M.W.Y.; Chu, T.-Y.; et al. Epigenetic silencing of PTPRR activates MAPK signaling, promotes metastasis and serves as a biomarker of invasive cervical cancer. *Oncogene* **2013**, *32*, 15–26.
41. Yin, J.; Liu, Q.; Chen, C.; Liu, W. Small regulatory polypeptide of amino acid response negatively relates to poor prognosis and controls hepatocellular carcinoma progression via regulating microRNA-5581-3p/human cardiolipin synthase 1. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 17589–17599.
42. Chen, M.; Zhang, Y.; Zheng, P.-S. Tafazzin (TAZ) promotes the tumorigenicity of cervical cancer cells and inhibits apoptosis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177171.
43. Pathak, S.; Meng, W.-J.; Zhang, H.; Gnosa, S.; Nandy, S.K.; Adell, G.; Holmlund, B.; Sun, X.-F. Tafazzin protein expression is associated with tumorigenesis and radiation response in rectal cancer: A study of Swedish clinical trial on preoperative radiotherapy. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98317.

44. Li, X.; Wu, M.; An, D.; Yuan, H.; Li, Z.; Song, Y.; Liu, Z. Suppression of Tafazzin promotes thyroid cancer apoptosis via activating the JNK signaling pathway and enhancing INF2-mediated mitochondrial fission. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 16238–16251.
45. Osellame, L.D.; Blacker, T.S.; Duchen, M.R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *26*, 711–723.
46. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
47. Lange, C.; Nett, J.H.; Trumpower, B.L.; Hunte, C. Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc1 complex structure. *EMBO J.* **2001**, *20*, 6591–6600.
48. Enríquez, J.A. Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annu. Rev. Physiol.* **2016**, *78*, 533–561.
49. Genova, M.L.; Lenaz, G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1837*, 427–443.
50. Claypool, S.M. Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 2059–2068.
51. Mileykovskaya, E.; Dowhan, W. Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chem. Phys. Lipids* **2014**, *179*, 42–48.
52. Fearon, K.; Strasser, F.; Anker, S.D.; Bosaeus, I.; Bruera, E.; Fainsinger, R.L.; Jatoi, A.; Loprinzi, C.; MacDonald, N.; Mantovani, G.; et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. *Lancet Oncol.* **2011**, *12*, 489–495.
53. Antunes, D.; Padrão, A.I.; Maciel, E.; Santinha, D.; Oliveira, P.; Vitorino, R.; Moreira-Gonçalves, D.; Colaço, B.; Pires, M.J.; Nunes, C.; et al. Molecular insights into mitochondrial dysfunction in cancer-related muscle wasting. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841*, 896–905.
54. Dumas, J.-F.; Goupille, C.; Julienne, C.M.; Pinault, M.; Chevalier, S.; Bougnoux, P.; Servais, S.; Couet, C. Efficiency of oxidative phosphorylation in liver mitochondria is decreased in a rat model of peritoneal carcinosis. *J. Hepatol.* **2011**, *54*, 320–327.
55. Peyta, L.; Jarnouen, K.; Pinault, M.; Coulouarn, C.; Guimaraes, C.; Goupille, C.; de Barros, J.-P.P.; Chevalier, S.; Dumas, J.-F.; Maillot, F.; et al. Regulation of hepatic cardiolipin metabolism by TNF α : Implication in cancer cachexia. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1851*, 1490–1500.
56. Kiebish, M.A.; Han, X.; Cheng, H.; Chuang, J.H.; Seyfried, T.N. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: Lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 2545–2556.

57. Ohlig, T.; Le, D.V.; Gardemann, A.; Wolke, C.; Gürtler, S.; Peter, D.; Schild, L.; Lendeckel, U. Effects of siRNA-dependent knock-down of cardiolipin synthase and tafazzin on mitochondria and proliferation of glioma cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2018**, *1863*, 379–387.
58. Gürtler, S.; Wolke, C.; Otto, O.; Heise, N.; Scholz, F.; Laporte, A.; Elsner, M.; Jörns, A.; Weinert, S.; Döring, M.; et al. Tafazzin-dependent cardiolipin composition in C6 glioma cells correlates with changes in mitochondrial and cellular functions, and cellular proliferation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2019**, *1864*, 452–465.
59. Lopez-Fabuel, I.; Le Douce, J.; Logan, A.; James, A.M.; Bonvento, G.; Murphy, M.P.; Almeida, A.; Bolaños, J.P. Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 13063–13068.
60. Li, Y.; Lou, W.; Raja, V.; Denis, S.; Yu, W.; Schmidtke, M.W.; Reynolds, C.A.; Schlame, M.; Houtkooper, R.H.; Greenberg, M.L. Cardiolipin-induced activation of pyruvate dehydrogenase links mitochondrial lipid biosynthesis to TCA cycle function. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 11568–11578.
61. Raja, V.; Joshi, A.S.; Li, G.; Maddipati, K.R.; Greenberg, M.L. Loss of Cardiolipin Leads to Perturbation of Acetyl-CoA Synthesis. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 1092–1102.
62. Rios Garcia, M.; Steinbauer, B.; Srivastava, K.; Singhal, M.; Mattijssen, F.; Maida, A.; Christian, S.; Hess-Stumpp, H.; Augustin, H.G.; Müller-Decker, K.; et al. Acetyl-CoA Carboxylase 1-Dependent Protein Acetylation Controls Breast Cancer Metastasis and Recurrence. *Cell Metab.* **2017**, *26*, 842–855.e5.
63. Lee, J.V.; Berry, C.T.; Kim, K.; Sen, P.; Kim, T.; Carrer, A.; Trefely, S.; Zhao, S.; Fernandez, S.; Barney, L.E.; et al. Acetyl-CoA promotes glioblastoma cell adhesion and migration through Ca²⁺-NFAT signaling. *Genes Dev.* **2018**, *32*, 497–511.
64. Schug, Z.T.; Peck, B.; Jones, D.T.; Zhang, Q.; Grosskurth, S.; Alam, I.S.; Goodwin, L.M.; Smethurst, E.; Mason, S.; Blyth, K.; et al. Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 57–71.
65. Yu, G.; Cheng, C.-J.; Lin, S.-C.; Lee, Y.-C.; Frigo, D.E.; Yu-Lee, L.-Y.; Gallick, G.E.; Titus, M.A.; Nutt, L.K.; Lin, S.-H. Organelle-Derived Acetyl-CoA Promotes Prostate Cancer Cell Survival, Migration, and Metastasis via Activation of Calmodulin Kinase II. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 2490–2502.

66. Carrer, A.; Trefely, S.; Zhao, S.; Campbell, S.L.; Norgard, R.J.; Schultz, K.C.; Sidoli, S.; Parris, J.L.D.; Affronti, H.C.; Sivanand, S.; et al. Acetyl-CoA Metabolism Supports Multistep Pancreatic Tumorigenesis. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 416–435.
67. Ma, Y.; Temkin, S.M.; Hawkrigde, A.M.; Guo, C.; Wang, W.; Wang, X.-Y.; Fang, X. Fatty acid oxidation: An emerging facet of metabolic transformation in cancer. *Cancer Lett.* **2018**, *435*, 92–100.
68. Miklas, J.W.; Clark, E.; Levy, S.; Detraux, D.; Leonard, A.; Beussman, K.; Showalter, M.R.; Smith, A.T.; Hofsteen, P.; Yang, X.; et al. TFPa/HADHA is required for fatty acid beta-oxidation and cardiolipin re-modeling in human cardiomyocytes. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4671.
69. Kiriya, Y.; Nochi, H. Intra- and Intercellular Quality Control Mechanisms of Mitochondria. *Cells* **2018**, *7*, 1.
70. Kameoka, S.; Adachi, Y.; Okamoto, K.; Iijima, M.; Sesaki, H. Phosphatidic Acid and Cardiolipin Coordinate Mitochondrial Dynamics. *Trends Cell Biol.* **2018**, *28*, 67–76.
71. Tilokani, L.; Nagashima, S.; Paupe, V.; Prudent, J. Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* **2018**, *62*, 341–360.
72. Kong, B.; Wang, Q.; Fung, E.; Xue, K.; Tsang, B.K. p53 is required for cisplatin-induced processing of the mitochondrial fusion protein L-Opa1 that is mediated by the mitochondrial metalloproteinase Oma1 in gynecologic cancers. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 27134–27145.
73. Kraus, F.; Ryan, M.T. The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission. *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 2953–2960.
74. Zhao, J.; Zhang, J.; Yu, M.; Xie, Y.; Huang, Y.; Wolff, D.W.; Abel, P.W.; Tu, Y. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* **2013**, *32*, 4814–4824.
75. Wan, Y.-Y.; Zhang, J.-F.; Yang, Z.-J.; Jiang, L.-P.; Wei, Y.-F.; Lai, Q.-N.; Wang, J.-B.; Xin, H.-B.; Han, X.-J. Involvement of Drp1 in hypoxia-induced migration of human glioblastoma U251 cells. *Oncol. Rep.* **2014**, *32*, 619–626.
76. Ban, T.; Ishihara, T.; Kohno, H.; Saita, S.; Ichimura, A.; Maenaka, K.; Oka, T.; Mihara, K.; Ishihara, N. Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19*, 856–863.
77. Ban, T.; Heymann, J.A.W.; Song, Z.; Hinshaw, J.E.; Chan, D.C. OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 2113–2122.

78. DeVay, R.M.; Dominguez-Ramirez, L.; Lackner, L.L.; Hoppins, S.; Stahlberg, H.; Nunnari, J. Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J. Cell Biol.* **2009**, *186*, 793–803.
79. Rujiviphat, J.; Meglei, G.; Rubinstein, J.L.; McQuibban, G.A. Phospholipid association is essential for dynamin-related protein Mgm1 to function in mitochondrial membrane fusion. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 28682–28686.
80. Bustillo-Zabalbeitia, I.; Montessuit, S.; Raemy, E.; Basañez, G.; Terrones, O.; Martinou, J.-C. Specific interaction with cardiolipin triggers functional activation of Dynamin-Related Protein 1. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102738.
81. Stepanyants, N.; Macdonald, P.J.; Francy, C.A.; Mears, J.A.; Qi, X.; Ramachandran, R. Cardiolipin's propensity for phase transition and its reorganization by dynamin-related protein 1 form a basis for mitochondrial membrane fission. *Mol. Biol. Cell* **2015**, *26*, 3104–3116.
82. Lemasters, J.J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res.* **2005**, *8*, 3–5.
83. Springer, M.Z.; Macleod, K.F. In Brief: Mitophagy: Mechanisms and role in human disease. *J. Pathol.* **2016**, *240*, 253–255.
84. Fujiwara, M.; Marusawa, H.; Wang, H.-Q.; Iwai, A.; Ikeuchi, K.; Imai, Y.; Kataoka, A.; Nukina, N.; Takahashi, R.; Chiba, T. Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **2008**, *27*, 6002–6011.
85. Poulogiannis, G.; McIntyre, R.E.; Dimitriadi, M.; Apps, J.R.; Wilson, C.H.; Ichimura, K.; Luo, F.; Cantley, L.C.; Wyllie, A.H.; Adams, D.J.; et al. PARK2 deletions occur frequently in sporadic colorectal cancer and accelerate adenoma development in Apc mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 15145–15150.
86. Veeriah, S.; Taylor, B.S.; Meng, S.; Fang, F.; Yilmaz, E.; Vivanco, I.; Janakiraman, M.; Schultz, N.; Hanrahan, A.J.; Pao, W.; et al. Somatic mutations of the Parkinson's disease-associated gene PARK2 in glioblastoma and other human malignancies. *Nat. Genet.* **2010**, *42*, 77–82.
87. Hu, H.-H.; Kannengiesser, C.; Lesage, S.; André, J.; Mourah, S.; Michel, L.; Descamps, V.; Basset-Seguín, N.; Bagot, M.; Bensussan, A.; et al. PARKIN Inactivation Links Parkinson's Disease to Melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **2016**, *108*, doi:10.1093/jnci/djv340.
88. Lee, S.; She, J.; Deng, B.; Kim, J.; de Andrade, M.; Na, J.; Sun, Z.; Wampfler, J.A.; Cunningham, J.M.; Wu, Y.; et al. Multiple-level validation identifies PARK2 in the

- development of lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease. *Oncotarget* **2016**, 7, 44211–44223.
89. Cesari, R.; Martin, E.S.; Calin, G.A.; Pentimalli, F.; Bichi, R.; McAdams, H.; Trapasso, F.; Drusco, A.; Shimizu, M.; Masciullo, V.; et al. Parkin, a gene implicated in autosomal recessive juvenile parkinsonism, is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25-q27. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 5956–5961.
 90. Lee, Y.S.; Jung, Y.Y.; Park, M.H.; Yeo, I.J.; Im, H.S.; Nam, K.T.; Kim, H.D.; Kang, S.K.; Song, J.K.; Kim, Y.R.; et al. Deficiency of parkin suppresses melanoma tumor development and metastasis through inhibition of MFN2 ubiquitination. *Cancer Lett.* **2018**, 433, 156–164.
 91. Maes, H.; Van Eygen, S.; Krysko, D.V.; Vandenabeele, P.; Nys, K.; Rillaerts, K.; Garg, A.D.; Verfaillie, T.; Agostinis, P. BNIP3 supports melanoma cell migration and vasculogenic mimicry by orchestrating the actin cytoskeleton. *Cell Death Dis.* **2014**, 5, e1127.
 92. Sun, L.; Li, T.; Wei, Q.; Zhang, Y.; Jia, X.; Wan, Z.; Han, L. Upregulation of BNIP3 mediated by ERK/HIF-1 α pathway induces autophagy and contributes to anoikis resistance of hepatocellular carcinoma cells. *Future Oncol. Lond. Engl.* **2014**, 10, 1387–1398.
 93. Wu, H.; Huang, S.; Chen, Z.; Liu, W.; Zhou, X.; Zhang, D. Hypoxia-induced autophagy contributes to the invasion of salivary adenoid cystic carcinoma through the HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* **2015**, 12, 6467–6474.
 94. Kagan, V.E.; Jiang, J.; Huang, Z.; Tyurina, Y.Y.; Desbourdes, C.; Cottet-Rousselle, C.; Dar, H.H.; Verma, M.; Tyurin, V.A.; Kapralov, A.A.; et al. NDPK-D (NM23-H4)-mediated externalization of cardiolipin enables elimination of depolarized mitochondria by mitophagy. *Cell Death Differ.* **2016**, 23, 1140–1151.
 95. Iriondo, M.N.; Etxaniz, A.; Varela, Y.R.; Hervás, J.H.; Montes, L.R.; Goñi, F.M.; Alonso, A. LC3 subfamily in cardiolipin-mediated mitophagy: A comparison of the LC3A, LC3B and LC3C homologs. *bioRxiv* **2020**, doi:10.1101/2020.07.14.202812.
 96. Petrosillo, G.; Moro, N.; Ruggiero, F.M.; Paradies, G. Melatonin inhibits cardiolipin peroxidation in mitochondria and prevents the mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, 47, 969–974.
 97. Hsu, P.; Liu, X.; Zhang, J.; Wang, H.-G.; Ye, J.-M.; Shi, Y. Cardiolipin remodeling by TAZ/tafazzin is selectively required for the initiation of mitophagy. *Autophagy* **2015**, 11, 643–652.

98. Huang, W.; Choi, W.; Hu, W.; Mi, N.; Guo, Q.; Ma, M.; Liu, M.; Tian, Y.; Lu, P.; Wang, F.-L.; et al. Crystal structure and biochemical analyses reveal Beclin 1 as a novel membrane binding protein. *Cell Res.* **2012**, *22*, 473–489.
99. Shimasaki, K.; Watanabe-Takahashi, M.; Umeda, M.; Funamoto, S.; Saito, Y.; Noguchi, N.; Kumagai, K.; Hanada, K.; Tsukahara, F.; Maru, Y.; et al. Pleckstrin homology domain of p210 BCR-ABL interacts with cardiolipin to regulate its mitochondrial translocation and subsequent mitophagy. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **2018**, *23*, 22–34.
100. Liu, X.; Kim, C.N.; Yang, J.; Jemmerson, R.; Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **1996**, *86*, 147–157.
101. Zamzami, N.; Marchetti, P.; Castedo, M.; Zanin, C.; Vayssière, J.L.; Petit, P.X.; Kroemer, G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.* **1995**, *181*, 1661–1672.
102. Komarov, A.P.; Rokhlin, O.W.; Yu, C.-A.; Gudkov, A.V. Functional genetic screening reveals the role of mitochondrial cytochrome b as a mediator of FAS-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14453–14458.
103. Wei, M.C.; Zong, W.X.; Cheng, E.H.; Lindsten, T.; Panoutsakopoulou, V.; Ross, A.J.; Roth, K.A.; MacGregor, G.R.; Thompson, C.B.; Korsmeyer, S.J. Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **2001**, *292*, 727–730.
104. Schug, Z.T.; Gottlieb, E. Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 2022–2031.
105. McMillin, J.B.; Dowhan, W. Cardiolipin and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1585*, 97–107.
106. Gonzalez, F.; Gottlieb, E. Cardiolipin: Setting the beat of apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **2007**, *12*, 877–885.
107. Gonzalez, F.; Schug, Z.T.; Houtkooper, R.H.; MacKenzie, E.D.; Brooks, D.G.; Wanders, R.J.A.; Petit, P.X.; Vaz, F.M.; Gottlieb, E. Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. *J. Cell Biol.* **2008**, *183*, 681–696.
108. Scorrano, L. Caspase-8 goes cardiolipin: A new platform to provide mitochondria with microdomains of apoptotic signals? *J. Cell Biol.* **2008**, *183*, 579–581.
109. Zhang, T.; Saghatelian, A. Emerging roles of lipids in BCL-2 family-regulated apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1831*, 1542–1554.
110. Raemy, E.; Martinou, J.-C. Involvement of cardiolipin in tBID-induced activation of BAX during apoptosis. *Chem. Phys. Lipids* **2014**, *179*, 70–74.

111. Shamas-Din, A.; Bindner, S.; Zhu, W.; Zaltsman, Y.; Campbell, C.; Gross, A.; Leber, B.; Andrews, D.W.; Fradin, C. tBid undergoes multiple conformational changes at the membrane required for Bax activation. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 22111–22127.
112. Caroppi, P.; Sinibaldi, F.; Fiorucci, L.; Santucci, R. Apoptosis and human diseases: Mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 4058–4065.
113. Sinibaldi, F.; Howes, B.D.; Piro, M.C.; Polticelli, F.; Bombelli, C.; Ferri, T.; Coletta, M.; Smulevich, G.; Santucci, R. Extended cardiolipin anchorage to cytochrome c: A model for protein-mitochondrial membrane binding. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 689–700.
114. Pereverzev, M.O.; Vygodina, T.V.; Konstantinov, A.A.; Skulachev, V.P. Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31 Pt 6*, 1312–1315.
115. Belikova, N.A.; Vladimirov, Y.A.; Osipov, A.N.; Kapralov, A.A.; Tyurin, V.A.; Potapovich, M.V.; Basova, L.V.; Peterson, J.; Kurnikov, I.V.; Kagan, V.E. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry* **2006**, *45*, 4998–5009.
116. Ott, M.; Zhivotovsky, B.; Orrenius, S. Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 1243–1247.
117. Petrosillo, G.; Ruggiero, F.M.; Pistolese, M.; Paradies, G. Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS Lett.* **2001**, *509*, 435–438.
118. Vladimirov, Y.A.; Sarisozen, C.; Vladimirov, G.K.; Filipczak, N.; Polimova, A.M.; Torchilin, V.P. The Cytotoxic Action of Cytochrome C/Cardiolipin Nanocomplex (Cyt-CL) on Cancer Cells in Culture. *Pharm. Res.* **2017**, *34*, 1264–1275.
119. Bartel, K.; Pein, H.; Popper, B.; Schmitt, S.; Janaki-Raman, S.; Schulze, A.; Lengauer, F.; Koeberle, A.; Werz, O.; Zischka, H.; et al. Connecting lysosomes and mitochondria—A novel role for lipid metabolism in cancer cell death. *Cell Commun. Signal. CCS* **2019**, *17*, 87.
120. Aryal, B.; Rao, V.A. Deficiency in Cardiolipin Reduces Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in Human B-Lymphocytes. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0158376.

Objectifs de la thèse

✓ Objectif 1

Bien qu'il ait été rapporté que la mitophagie joue un rôle positif dans le maintien de l'homéostasie mitochondriale, une mitophagie défectueuse ou excessive peut entraîner le développement de certaines pathologies (Palikaras and Tavernarakis 2014). L'induction de la mitophagie joue un double rôle dans la conduite du processus du cancer. L'activité suppresseur de tumeur de la mitophagie a déjà été démontrée dans de nombreux types de cancers (Fujiwara et al. 2008; Pouligiannis et al. 2010). Par exemple, dans le cancer du sein, il a été montré qu'une mitophagie réduite / défectueuse favorisait la croissance tumorale et les métastases et prédisait une faible survie sans métastase (Deng et al. 2020; Chourasia, Boland, and Macleod 2015). Cependant, selon les stades de développement de la tumeur, la mitophagie peut également être impliquée dans la tumorigénèse en favorisant la survie des cellules tumorales et les métastases (Lee et al. 2018; Maes et al. 2014). Il a ainsi été montré que l'activation de la mitophagie réduit l'apoptose induite par le médicament dans les cellules cancéreuses du sein, ce qui suggère qu'une fois qu'une tumeur a progressé à un stade avancé, la mitophagie peut atténuer le stress induit par le traitement et participer à la chimiorésistance des cellules cancéreuses (Biel and Rao 2018; Si et al. 2020). Certaines études suggèrent que l'activation de la mitophagie conduit à une résistance au traitement à la DOX. Par exemple, la mitophagie médiée par NIX entraîne une résistance à la DOX dans les cellules cancéreuses colorectales HCT8 (Yan et al. 2017).

Les études précédentes au sein de notre laboratoire proposent une reprogrammation du métabolisme énergétique mitochondrial dans la lignée cellulaire cancéreuse du sein résistante à la DOX (MCF-7dox) avec une diminution de la consommation d'oxygène mitochondriale liée à la synthèse d'ATP et une meilleure efficacité de la synthèse d'ATP mitochondrial (Dartier et al. 2017). Ce résultat suggère que la mitophagie serait plus active dans les MCF-7dox.

Un des mécanismes de la cytotoxicité induite par la DOX implique la génération des ERO mitochondriaux (Jamieson and Boddy 2011). Le stress oxydatif est lié au fonctionnement mitochondrial car les mitochondries sont à la fois génératrices et cibles des ERO (Lee, Giordano, and Zhang 2012). Il est envisageable que les ERO produites en réponse à la DOX puissent jouer un rôle dans la mitophagie pour protéger les mitochondries et les cellules contre la drogue. Cependant, le lien entre la mitophagie, les ERO et le fonctionnement mitochondrial n'a pas été très clairement étudié dans le contexte de la résistance à la DOX dans le cancer du sein. Ainsi, le premier objectif de ma thèse était de :

-
-

- Déterminer un lien entre la mitophagie associée à la résistance des cellules cancéreuses mammaires à la DOX et le métabolisme énergétique mitochondrial et les ERO mitochondriales.

✓ Objectif 2

Il est probable que la reprogrammation du métabolisme des CL observée dans les quelques études cliniques disponibles joue un rôle dans l'agressivité des cancers. Les études précédentes au sein de notre laboratoire ont montré que la lignée cancéreuse mammaire résistante à la DOX (MCF-7dox) se caractérise par une modification du métabolisme des CL avec une diminution de la quantité de CL détecté par la technique HPTLC (**Figure 25A**). Cette modification du métabolisme des CL est associée à une diminution de l'activité de la CL synthase (CLS) et une diminution d'expression protéique de la tafazzin (TAZ), les deux principales enzymes impliquées dans la biosynthèse et le remodelage des CL respectivement (**Figure 25B et Figure 25C**). De ce fait, le deuxième objectif de ma thèse était :

- Étudier le rôle du métabolisme des CL et de ses enzymes clés dans la chimiorésistance associée au cancer du sein.

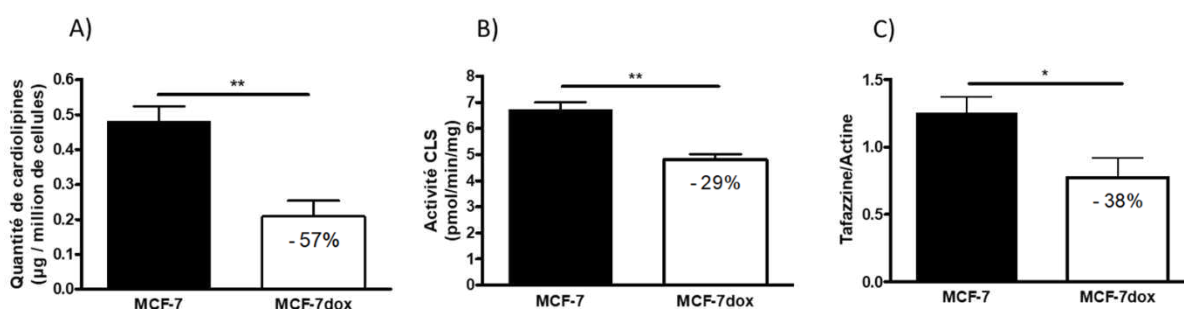


Figure 25. Altération du métabolisme des CL dans les cellules MCF-7dox. A) quantité des CL, B) activité de la Cardiolipine Synthase (CLS), C) expression protéique de la tafazzin (TAZ).

✓ Objectif 3

La composition en acides gras des CL est essentielle à la bioénergétique mitochondriale. La CL est sensible à la peroxydation lipidique en raison de sa teneur élevée en chaînes d'acides gras polyinsaturés. Cette peroxydation des CL permet, notamment, de réguler la mort cellulaire mitochondriale via la libération de cytochrome c. Par conséquent, la modification de la composition en acides gras de la chaîne latérale des CL peut influencer la peroxydation des CL et altérer la réponse apoptotique et peut, donc, jouer un rôle dans l'agressivité du cancer. Le troisième objectif de ma thèse était :

- **Comparer les profils des CL entre des cellules mammaires non cancéreuses et des cellules cancéreuses mammaires plus ou moins agressives**

MATERIELS ET METHODES

1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires de carcinome du sein humain MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (LGC Promochem, France). Ces cellules ont été isolées en 1973 par le Dr Soule et ses collègues à partir de l'épanchement pleural d'une femme de 69 ans atteinte d'un cancer métastatique (Comşa, Cîmpean, and Raica 2015). La lignée MCF-7dox a été donnée au laboratoire par le Dr K. Cowan (National Cancer Institute, Bethesda, MD). Cette lignée a été initialement établie par sélection in vitro de clones résistants à des concentrations chroniques croissantes de doxorubicine (DOX) (Fairchild et al. 1987). Les deux lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu DMEM 4,5 g/L de glucose (Lonza) contenant 5% de sérum de veau fœtal (SVF). Les cellules MCF-7dox ont également été cultivées en présence de 1 μ M de DOX pour maintenir le phénotype multirésistant. Une semaine avant la réalisation des expériences, les cellules MCF-7dox ont été retirées du milieu contenant de la DOX et maintenues dans un milieu sans DOX comme décrit précédemment (Fairchild et al. 1987). Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées à 37 ° C dans un incubateur humidifié avec 5% de CO₂. Le milieu de culture a été changé toutes les 72h.

2. Obtention des lignées Knock-Out de TAZ (KO-TAZ)

Les lignées cellulaires Knock-Out (KO) pour la taffazine (TAZ) ont été obtenues à l'aide du système Crispr/Cas9. Ces lignées KO-TAZ ont été obtenues grâce à la collaboration avec les Dr Laurent Maillet et Dr Sophie Barillé-Nion (Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers). Les deux lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu DMEM 4,5 g/L de glucose (Lonza) contenant 5% de sérum de veau fœtal (SVF). Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées à 37 ° C dans un incubateur humidifié avec 5% de CO₂. Le milieu de culture a été changé toutes les 72h.

3. Inhibition de l'expression génique de pink-1 par ARN interférents

L'inhibition transitoire de l'expression transcriptionnelle du gène PINK-1 a été réalisé par la technique des petits ARN interférents (siRNA). Les cellules ont étéensemencées dans une plaque à 6 puits (bdBioSciences) à une densité de 0,4 million de cellules / puits dans 2 ml de milieu de culture. Le jour suivant, la transfection a été réalisée en utilisant un siRNA dirigé contre PINK-1 (siPINK-1) (sc-44598, Santa Cruz Biotechnology). Un siRNA témoin (siCTRL) (sc-37007, Santa Cruz Biotechnology) a été utilisé en parallèle. La solution de transfection a été réalisée dans du PepMute™ siRNA Transfection Reagent (SignaGen Laboratories) contenant 30 pmol de siPINK-1 ou 30 pmol de siCTRL, 100 μ L de tampon de transfection et

3,6 µl de réactif PepMute, puis ajouté au milieu de culture cellulaire. Le lendemain, le milieu a été changé et les cellules incubées pendant 48 h.

4. RT-qPCR

4.1) Extraction d'ARN

L'ARN total a été extrait à l'aide du kit NucleoSpin (Macherey-Nagel GmbH & Co, Allemagne). La quantification des ARN totaux a été réalisée par spectrophotométrie à 260 nm. Le ratio de densité optique 260/230 nm et 260/280 nm a été calculé afin d'évaluer la pureté de l'ARN par rapport aux solvants et les protéines respectivement.

4.2) Transcriptase inverse

La transcription inverse (RT) a été réalisée à l'aide du kit PrimeScript RT-PCR (TAKARA, Ozyme, France). Cette technique permet la transcription de l'ARNm en ADN complémentaire (ADNc) grâce à l'activité de l'enzyme transcriptase inverse (RT). Pour cela, un mélange réactionnel contenant 500 ng d'ARN, le tampon RT, les oligonucléotides, les amorces aléatoires et l'enzyme RT a été préparé. Le mélange réactionnel a été incubé dans un thermocycleur (Labcycler, SensoQuest) pendant 15 min à 37°C afin d'activer la transcription inverse, puis l'enzyme a été inactivé à 85°C pendant 5 secondes.

4.3) Quantitative Polymerase Chain Reaction (q-PCR)

La q-PCR est une technique qui permet une amplification exponentielle des séquences d'ADN. Ceci nécessite une paire d'amorces complémentaires de la séquence d'intérêt. Les amorces sont prolongées par l'ADN polymérase. Les copies produites après l'extension, dites amplicons, sont réamplifiées avec les mêmes amorces conduisant ainsi à une amplification exponentielle des molécules d'ADN. La quantification des produits de PCR est basée sur la détection de la fluorescence produite par une molécule rapportrice qui augmente au fur et à mesure de la réaction.

Les expériences de q-PCR ont été réalisées dans des plaques 96 puits à l'aide du thermocycleur LightCycle® 480 II (Roche, Bâle, Suisse) selon les étapes suivantes : un cycle de pré-incubation (50°C pendant 5 min), 45 cycles d'amplification (95°C pendant 10 secondes permettant la séparation de la double chaîne de l'acide nucléique, 60°C pendant 30 secondes permettant la liaison des amorces avec la matrice d'ADN, 72°C pendant 20 secondes facilitant la polymérisation réalisée par l'ADN polymérase), et un cycle de refroidissement (40°C pendant 30 secondes).

La quantification des séquences amplifiées par PCR est réalisée avec le SYBR® qPCR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus, Takara), à partir de 50 ng d'ADNc dans un volume final de

10 µL. Les amorces (HPRT1 et PINK-1) sont utilisées à une concentration finale de 500 nM. L'amorce utilisée pour quantifier HPRT-1 (Sigma) est la suivante : sequence sens ; TGACCTTGATTTATTTTGCATACC et sequence anti-sens ; CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT. Pour PINK-1, nous avons utilisé une amorce spécifique de Santa Cruz BioTechnologie (sc-44598-PR). L'expression relative du gène PINK-1 a été normalisée par la HPRT et calculée à l'aide de la méthode 2- Δ Ct.

5. Western blot

5.1) Extraction des protéines et dosage

Les culots cellulaires ont été solubilisés dans un tampon de lyse (triton 1%, base Tris 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM) supplémenté avec un inhibiteur de protéase (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma, France). Les échantillons ont ensuite été incubés sur la glace pendant 10 min, puis centrifugés à 11 000 x g à 4 °C pendant 10 min. Le surnageant contenant des extraits de protéines a été recueilli et les protéines ont été quantifiées en utilisant le kit de dosage des protéines BCA (Life Technologies). Le principe du dosage par BCA (BicinChoninique Acide) repose sur la formation d'une complexe protéine-Cu²⁺ dans des conditions alcalines, suivi de la réduction du Cu²⁺ en Cu¹⁺ détectée à 562 nm. La quantité d'ions réduits est proportionnelle à la quantité de protéine présente.

5.2) Migration sur gel d'électrophorèse

Vingt-cinq µg d'extrait protéique ont été préparés dans un volume de 15 µl contenant de l'eau, un tampon de charge dodécyl sulfate de lithium 4X non réducteur (ThermoFisher Scientific, Pierce) ainsi qu'un agent réducteur et dénaturant NuPAGE 10X contenant 500 mM de dithiothréitol (DTT) (Thermo Scientific, Pierce). Les protéines ont ensuite été chauffé à 95°C pendant 5 min puis déposés dans les puits d'un gel d'électrophorèse 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ (Bio-Rad) où la migration s'est effectuée à 130 V.

5.3) Transfert sur la membrane et révélation

Le transfert des protéines a été réalisé dans des conditions semi-sèches (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad) en utilisant une membrane PVDF. La membrane contenant des protéines a ensuite subi une étape de saturation en présence de TBS-Tween 0,1 % contenant 4 % de BSA pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Cette étape permet d'éviter les interactions non spécifiques entre l'anticorps et la protéine. Les protéines d'intérêt ont ensuite été détectées par incubation à 4°C pendant une nuit avec les anticorps primaires suivantes ; BNIP3 (44060S), NIX (D4R4B), PINK-1 (6946S), TOM20 (4272S), COX IV (4850S), HIF-1 alpha (D1S7W) ou VDAC-1 (ab34726, Abcam). Tous les anticorps primaires

utilisés ont été achetés chez Cell Signaling sauf VDAC-1 et ont été diluées dans du TBS-Tween contenant 4% de BSA. Le jour suivant, les membranes ont été lavées deux fois avec du TBS 0,1% Tween puis incubées avec l'anticorps secondaire (Santa Cruz BioTechnology) diluées dans du TBS-Tween contenant 0,5% de BSA pendant 1 heure à température ambiante. Enfin, les membranes ont été lavées trois fois pendant 5 min avec du TBS 0,1% Tween et révélées à l'aide du kit ECL de GE Healthcare. Le témoin des dépôts a été réalisé à l'aide de la β -actine (sc-47778, Santa Cruz BioTechnology). Les images ont été prises à l'aide du système d'imagerie ChemiDoc MP (Bio-Rad).

6. Préparation de mitochondries isolées

Toutes les étapes ont été effectuées à 4 °C pour éviter la dégradation des protéines et des enzymes. Des culots cellulaires (7 millions de cellules) ont été solubilisés dans 100 μ l de PBS (Lonza) auxquels 100 μ l de digitonine 4 mg / ml ont été ajoutés. La digitonine est un détergent utilisé pour la perméabilisation des membranes cellulaires. Les cellules ont été incubées à 4 ° C pendant 10 min sous agitation. Après 10 min, 1 ml de PBS a été ajouté afin d'inhiber l'activité de la digitonine. Après une centrifugation de 10 min à 10 000 x g à 4 ° C, le culot mitochondrial a été remis en suspension dans un tampon AC / BT (acide aminocaproïque 1,5 M, Bis-Tris 75 mM, pH 7,0) contenant une anti-protéase et la concentration en protéines a été déterminée en utilisant le kit de dosage des protéines BCA (Life Technologies).

7. Microscopie à fluorescence

L'activité de mitophagie a été étudiée en mesurant la colocalisation des mitochondries et des lysosomes. Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 24 puits (ibidi Polymer Coverslip) à une densité de 40 000 cellules par puits dans 500 μ l de milieu de culture. Le lendemain, les cellules ont mis en contact avec différents inducteurs de mitophagie pendant 24 h : du FCCP ; (Sigma) à 2,5 μ M et du CoCl₂ (Sigma) à 100 μ M. Les traitements avec FCCP et CoCl₂ seront considérés comme le control positive de l'activation de la mitophagie. FCCP est un agent découpleur permettant la dépolarisation de la membrane mitochondriale. CoCl₂ permet la stabilisation et l'activation de HIF-1 α , mimant ainsi, la condition d'hypoxie. L'activité mitophagie a été également étudiée suite au traitement avec 1 μ M de mitoTEMPO (anti-oxydant mitochondriale) (Sigma). Le traitement avec mitoTEMPO permettra d'étudier si les stress oxydants peuvent participer dans l'activation de la mitophagie. Le traitement des MCF-7 et des MCF-7dox par la doxorubicine a été réalisé avec des concentrations de 100 nM et 30 μ M respectivement. Le jour de l'expérience, les mitochondries et les lysosomes ont été marqués sur cellules vivantes grâce à des sondes fluorescentes pendant 45 min. Le marquage des mitochondries a été réalisé avec MitoTracker TM Green FM (m7514, Thermofischer) à une

concentration de 100 nM permettant la coloration des mitochondries quel que soit leur potentiel de membrane. La coloration des lysosomes a été réalisée en utilisant 60 nM de colorant LysoTracker™ Deep Red (Invitrogen). Les images ont été observées en utilisant le microscope à fluorescence (Nikon eclipse Ti, Okolab) et le logiciel d'imagerie de microscope Nikon's NIS-Elements.

Le coefficient de corrélation de Pearson (PCC ou r) a été utilisé pour quantifier la colocalisation. Le principe est basé sur la mesure de la corrélation linéaire entre deux groupes de données. L'analyse statistique de ce coefficient pour quantifier la colocalisation a été calculé selon la formule suivante ; $PCC = \frac{\sum_i (R_i - R) \times (G_i - G)}{\sqrt{\sum_i (R_i - R)^2 \times \sum_i (G_i - G)^2}}$ où R_i et G_i se réfèrent aux valeurs d'intensité des canaux rouge et vert, respectivement, du pixel i , et R et G se réfèrent aux intensités moyennes des canaux rouge et vert, respectivement, sur toute l'image. Les valeurs de PCC vont de 1 (pour deux images dont les intensités de fluorescence sont parfaitement liées linéairement), à -1 (pour deux images dont les intensités de fluorescence ne sont pas liées l'une à l'autre). Les valeurs proches de zéro reflètent les distributions de sondes qui ne sont pas corrélées les unes aux autres.

8. Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du test à la sulforhodamine B (SRB). Il mesure indirectement la croissance cellulaire en formant un complexe colorimétrique (540 nm) dont l'intensité est proportionnelle au nombre de cellules présentes. Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 24 puits (bdBioSciences) à une densité de 30 000 cellules / puits dans 0,5 ml de milieu de culture. Le milieu de culture contenant ou non les traitements a été retiré des puits et les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS avec du calcium et du magnésium (Lonza). Les cellules ont ensuite été fixées avec 50% de TCA (Trichloroacetic Acid, Sigma-Aldrich) puis incubées 1 h à 4 °C. Deux cents µl de SRB (Sigma Aldrich) à 0,4% (dilué dans 1% d'acide acétique) ont été ajoutés aux cellules pendant 15 minutes sous agitation à température ambiante. La solution de SRB a été éliminée avec de l'acide acétique à 1%, puis les cellules ont été lysées avec une Tris base 10 mM (ThermoFisher). L'absorbance de chaque puits a été lue à 540 nm. L'expérience a été réalisé sur les cellules MCF-7dox transfectées par siPink-1 et traité avec doxorubicine et S63 (molécule BH3 mimétique) afin d'étudier l'effet de l'invalidation du gène Pink-1 sur la chimio sensibilité des cellules. Suite à une transfection des cellules MCF-7dox durant 48 h, les cellules ont été décollé et réensemencé dans les puits de plaque 24 puits. Le lendemain, les cellules ont été traités avec 15 µM de doxorubicine (Sigma)

pendant 72 heures, ce qui correspond à la CI50 pendant 3 jours. Le milieu de culture était renouvelé chaque jour pendant 72 h (**Figure 26**).

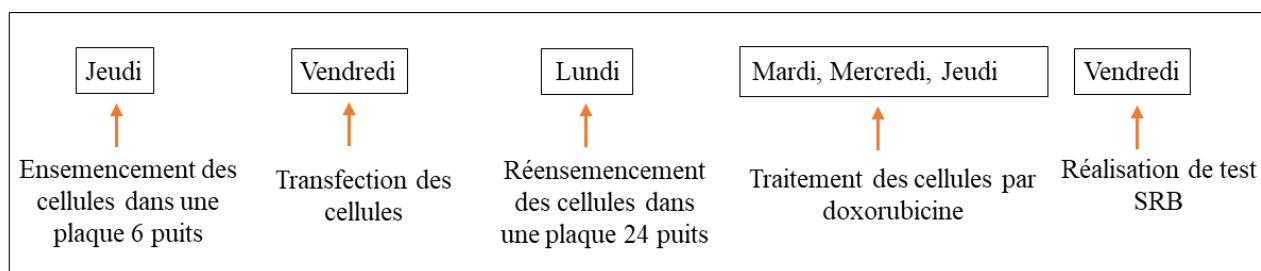


Figure 26. Schéma représentatif du protocole de traitement par DOX ou S63 des cellules transfectées par si-Pink-1.

9. Activité de Caspase 9

L'activité de Caspase 9 a été mesurée en utilisant le kit de test Caspase 9 (ab65608, Abcam) permettant de mesurer l'activité des caspases qui reconnaissent la séquence LEHD. Le test est basé sur la détection spectrophotométrique du chromophore p-nitroanilide (p-NA) après clivage du substrat marqué LEHD-p-NA. L'émission lumineuse de p-NA a été quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre à 400 nm.

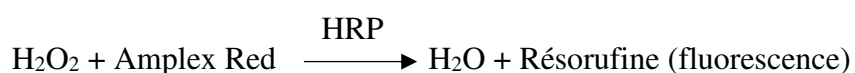
Les cellules MCF-7dox transfectées par siPink-1 ont été décollées et réensemencées dans un flasque 25 cm à une densité de 40 000 cellules par cm³. Le lendemain, les cellules ont été traitées avec 15 µM de doxorubicine (Sigma) pendant 72 heures, ce qui correspond à la CI50 pendant 3 jours. Le milieu de culture était renouvelé chaque jour pendant 72 h. La staurosporine (Sigma) à une concentration de 5 µM a été utilisée en tant que témoin positif de l'activité apoptotique. Le jour de l'expérience, les cellules ont été décollées et centrifugées à 700 x g pendant 5 min. Les protéines sont extraites à partir de culots cellulaires et quantifiées en utilisant le kit de dosage des protéines BCA (Life Technologies). Quatre µg / µl de protéines ont été préparés dans 50 µl de tampon de réaction 2x (abcam) et mis en contact avec 10 mM de 1,4-dithiothréitol (DTT) afin de maintenir les groupes SH à l'état réduit. Cinq µl du substrat LEHD-p-NA à une concentration 4 mM ont été ajoutés aux échantillons et incubés à 37 °C pendant 2 heures. L'absorbance a été lue à 540 nm.

10. Production des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

La production d'ERO a été étudiée via une nouvelle approche combinant la respirométrie haute résolution et la mesure fluorométrique de la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en utilisant une chambre de 2 mL OROBOROS Oxygraph 2K (Oroboros Instruments, Innsbruck, Autriche). Cette technique permet de mesurer la quantité de H₂O₂ produits en fonction de l'O₂ consommé et le rapport de flux H₂O₂ / O₂ est appliqué pour évaluer

l'importance relative de la production de H₂O₂ à différents états respiratoires (Makrecka-Kuka, Krumschnabel, and Gnaiger 2015).

La concentration d'oxygène est mesurée par une électrode de Clark qui contient une cathode en platine et une anode en Ag / AgCl séparées par une solution concentrée de KCl. Une tension est appliquée (~ 0,6 à 0,8 V) et ces deux demi-cellules sont séparées du milieu d'incubation par une membrane perméable à l'O₂. L'O₂ dissous diffuse de la solution à travers la membrane et est réduit par des électrons à la cathode selon la réaction suivante ; $O_2 + 2 H_2O + 4 e^- = 4 OH^-$. 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. La production de H₂O₂ a été évaluée en mesurant la fluorescence émise suite à sa réaction avec l'Amplex Red (1 µM) (exc-em: 560-584 nm - Interchim, France). La présence de Horse Radish Peroxydase (HRP) (10 UI / mL) est nécessaire pour la conversion de l'Amplex Red en résorufine (fluorescence). La superoxyde dismutase (40 UI / mL) a été ajoutée pour convertir tout le superoxyde en H₂O₂. L'expérience a été réalisée à 37 °C sous agitation continue. La réaction catalysée par HRP est la suivante :



Les cellules (5 millions) ont été perméabilisées par la digitonine (8 µg pour 1 million de cellules pour les MCF-7 et 10 µg pour 1 million de cellules pour les MCF-7dox). Les cellules perméabilisées ont été remises en suspension dans le tampon de respiration (10 mM de KH₂PO₄, 300 mM de mannitol, 10 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 1 mM d'EGTA et 0,1% de sérumbumine bovine (BSA) sans acide gras, pH 7,4). L'expérience a été réalisée en présence de glutamate (5 mM) et de malate (5 mM) comme substrats respiratoires du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale.

11. Assemblage des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et supercomplexes

L'assemblage des complexes a été analysé par électrophorèse Blue Native (BN Page) selon le protocole décrit par (Leman et al. 2015). Les mitochondries ont été isolées à partir de culots cellulaires (7 millions de cellules) par centrifugation différentielle (10 000 x g, 10 minutes, 4 ° C) après perméabilisation de la membrane plasmique à l'aide de digitonine. Les complexes mitochondriaux ont été solubilisés dans du laurylmaltoside (3 g / g de protéines) et 50 µg de protéines ont été déposés dans les puits d'un gel d'acrylamide natif à 4-16%. Les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF dans un appareil de transfert (Bio-Rad). Les membranes ont été incubées avec des anticorps dirigés contre NDUFB6 et NDUF2 pour

le complexe I, SDHA pour le complexe II, III core 2 pour le complexe III et COX Va pour le complexe IV (1 / 1000e, Abcam) et les bandes ont été révélées par chimioluminescence sur un appareil Odyssey (Li-Cor Biosciences). Pour la détection des supercomplexes, le même protocole a été appliqué sauf pour la solubilisation avec du larylmatoside qui a été remplacé par la digitonine (3g / g de protéines).

12. Activités enzymatiques mitochondriales

Les activités des complexes mitochondriaux OXPHOS ont été mesurées à 37 °C avec un spectrophotomètre UVmc2 (SAFAS, Monaco). L'activité de l'ubiquinone réductase (CI) NADH, de la succinate ubiquinone réductase (CII), de l'ubiquinol cytochrome C réductase (CIII), du cytochrome C oxydase (CIV) et de la citrate synthase (CS) a été mesurée selon les protocoles décrits (Medja et al. 2009).

13. Etude de métabolisme des cardiolipines

13.1) Spectrométrie de masse

L'analyse de la quantité et de la composition des CL a été réalisée par la technique de spectrométrie de masse sur la plateforme de lipidomique (Université de Bourgogne, INSERM UMR1231 / LabEx LipSTIC). Les expériences ont été réalisées avec 7 millions de cellules.

13.2) High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)

les lipides ont été extraits selon le protocole de Bligh et Dyer (Bligh and Dyer 1959). Afin de quantifier la cardiolipine (CL) et la monolysocardiolipine (MLCL), des standards et des échantillons ont été chargés sur des plaques de silice à l'aide d'un applicateur d'échantillons Linomat V (CAMAG, Muttenz Suisse). Après migration, les plaques ont été immergées dans le sulfate de cuivre (10% p / v) dans une solution d'acide phosphorique à 8% (v / v) et ensuite chauffées à 160 ° C pendant 15 minutes pour colorer tous les phospholipides. La quantification a été réalisée à l'aide du visualiseur de chromatographie sur couche mince Reprostar 3® et du logiciel WinCats VideoScan® (CAMAG, Muttenz Suisse).

14. Migration cellulaire en insert

La migration cellulaire a été évaluée par la capacité des cellules à se déformer pour passer à travers des pores de 8 µm dans des inserts (Falcon, France). L'emplacement de l'insert dans le puits permet la formation de deux compartiments. Le compartiment supérieur est l'endroit où les cellules sontensemencées, et le réservoir inférieur est l'endroit où la solution de chimio attractant est placée. Les expériences de migration dans notre étude ont été faites avec un gradient de sérum 5-10 % et les cellules ont été ensemencées à une densité de 20 000 cellules

par insert. L'expérience a été réalisée 24h après l'ensemencement des cellules. Après 24 h de migration à 37°C, 5% de CO₂, les inserts sont rincés au PBS, puis les cellules sont fixées avec de l'éthanol 100% pendant 10 min. Les cellules n'ayant pas migré ont été éliminées à l'aide d'un coton-tige. Les noyaux ont ensuite été marqués au DAPI (1 mg/mL) (Sigma, France) dilué au 1/5000ème dans du PBS sans Mg²⁺/Ca²⁺. Cinq photos par insert ont prises au microscope à fluorescence Nikon TI-S (Nikon, France) et comptées grâce à logiciel Image-j. Les données obtenues pour chaque condition ont été relativisées par rapport à la condition témoin.

15. Analyse du cycle cellulaire

L'analyse du cycle cellulaire a été effectuée en collaboration avec l'équipe de Pr Olivier Herault et a été réalisée au CHRU de Tours, Service d'Hématologie Biologique. L'expérience a été réalisée avec le kit ADN BD Cycletest Plus (BD Biosciences), selon les instructions du fabricant. Pour déterminer la proportion de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire, le contenu en ADN dans chaque cellule est mesuré grâce à un agent intercalant fluorescent, l'iodure de propidium. Les culots cellulaires (1 million de cellules) ont été fixés avec de l'éthanol 70 % et suspendu dans 800 µL de PBS contenant 10 µL d'ARNase à 10 mg/mL pour éliminer tous les ARN qui pouvaient se fixer à l'iodure de propidium et ainsi fausser les analyses. Ensuite, une solution d'iodure de propidium à concentration 1 mM a été ajoutée. Les mesures ont ensuite été réalisées par à l'aide d'un cytomètre en flux.

16. Mesure du métabolisme énergétique mitochondriale

La mesure de métabolisme énergétique mitochondriale a été effectuée en collaboration avec l'équipe de Pr Olivier Herault et a été réalisée au CHRU de Tours (Service d'Hématologie Biologique) à l'aide de l'analyseur de flux extracellulaire (XF) Seahorse™ XF96 (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA). Cette technique permet de mesurer en temps réel la consommation d'oxygène (OCR) et l'acidification extracellulaire (ECAR) des cellules vivantes dans une microplaque en réponse à différents substrats ou inhibiteurs. L'OCR et l'ECAR ont été exprimés en pmoles / min pour l'OCR et mpH / min pour l'ECAR.

16.1) Mesure du métabolisme respiratoire

Les paramètres clés de la fonction mitochondriale (OCR) suivants ont été mesurés (**Figure 27**) ;

- Consommation d'oxygène basale (mesurée après ajout de glucose dans le milieu)
- Consommation d'oxygène proportionnelle au gaspillage énergétique (« fuite de protons »), mesurée après ajout d'oligomycine.

- Consommation d'oxygène liée à la production d'ATP = consommation d'oxygène basale – consommation d'oxygène liée au gaspillage énergétique
- Consommation d'oxygène maximale (mesuré après ajout de FCCP ou DNP)
- Capacité de réserve (donner la formule)
- consommation d'oxygène non-mitochondriale (consommation d'oxygène résiduelle obtenue après ajout d'antimycine A et de roténone). Cette valeur est soustraite aux consommations d'oxygène précédentes.

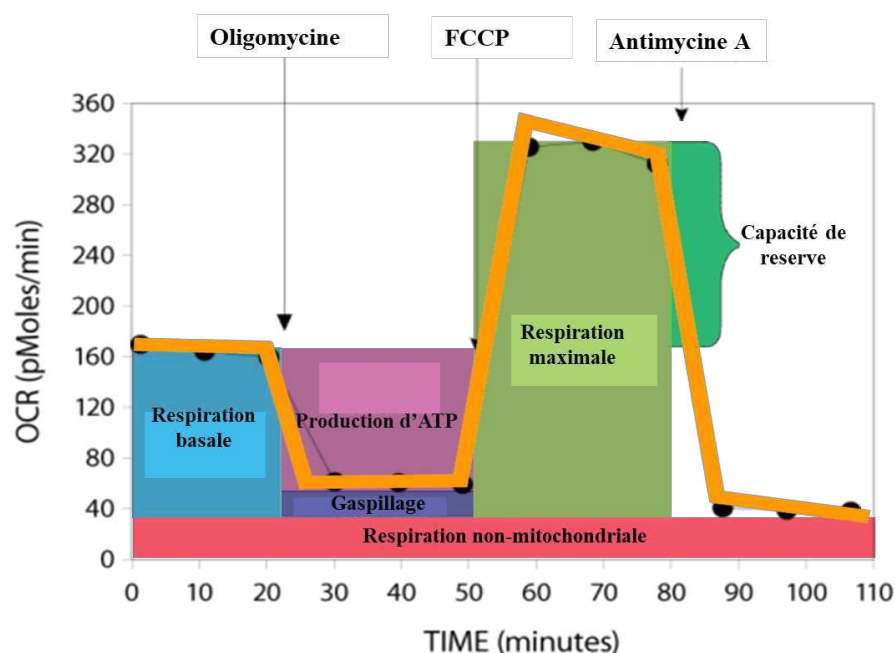


Figure 27. Le principe de la mesure de consommation d'oxygène.

L'expérience a été réalisée selon les instructions du fabricant. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de culture cellulaire XF96 à raison de 10^4 cellules par puits. Le jour de l'analyse, le milieu de culture a été remplacé par du milieu XF DMEM, dépourvu de glucose et SVF (pH 7,4), et supplémenté en glutamine (2 mM). Les cellules ont ensuite été incubées à 37 °C dans un incubateur sans CO₂ pendant 1 h. Des injections séquentielles de glucose 10 mM, d'oligomycine 1 µM (inhibiteur d'ATP synthase), de dinitrophénol (DNP) 100 µM (agent découplant) ou de roténone 0,5 mM (inhibiteur de complexe I) et d'antimycine A 0,5 mM (inhibiteur de complexe III) ont été réalisées selon les spécifications techniques du fournisseur pour déterminer les principaux paramètres cités ci-dessus (Sigma-Aldrich).

16.2) Mesure du métabolisme glycolytique

Les paramètres clés de la fonction glycolytique (ECAR) suivants ont été mesurés (Figure 28) :

- Acidification non-glycolytique. Celui-ci est mesuré avant d'ajouter le glucose et après l'ajout de 2-DG (inhibiteur de glycolyse) en fin d'expérience
- Glycolyse (après ajout de glucose)
- Capacité Glycolytique (après ajout d'oligomycine)
- Réserve Glycolytique. Ce paramètre est mesuré selon la formule :

$$\text{Reserve glycolytique} = \text{Capacité glycolytique} - \text{Glycolyse}$$

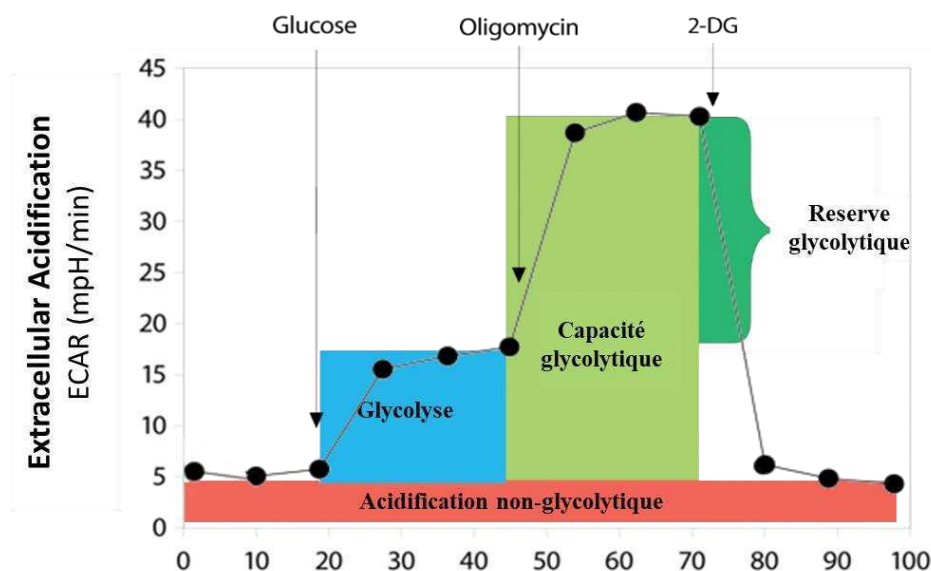


Figure 28. Le principe de la mesure de l'activité glycolytique.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de culture cellulaire XF96 à raison de 10^4 cellules par puits. Le jour de l'analyse, le milieu de culture a été remplacé par du milieu XF DMEM, dépourvu de glucose et SVF (pH 7,4), et supplémenté en glutamine (2 mM). Les cellules ont ensuite été incubées à 37 ° C dans un incubateur sans CO₂ pendant 1 h. Des injections séquentielles de glucose 10 mM, d'oligomycine 1 µM (inhibiteur d'ATP synthase) et 2-deoxyglucose (2-DG) 100 mM (inhibiteur de glycolyse) ont été effectuées afin de mesurer les paramètres ci-dessus.

16.3) Mesure de la production d'ATP

Des productions spécifiques d'ATP mitochondrial et glycolytique ont été évaluées à l'aide du kit d'analyse de mesure d'ATP en temps réel Seahorse XF (Seahorse Bioscience) selon le protocole du fabricant. Les résultats ont été normalisés par rapport à la teneur en ADN par puits en utilisant un colorant CyQuant (ThermoFisher Inc). L'expérience a été réalisée au CHRU de Tours (Service d'Hématologie Biologique).

17. Tests statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel graphPad Prism. La signification entre les groupes a été déterminée par one-way ANOVA avec le test de comparaisons multiples de Sidak ou par le test de Mann-Whitney pour deux groupes et de Kruskal-Wallis pour les comparaisons multiples. Les résultats ont été exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $p < 0,05$ était considéré comme statistiquement significatif.

RESULTATS PARTIE I

Introduction

La mitophagie est une forme sélective d'autophagie dans laquelle les mitochondries endommagées ou excessives sont dégradées, souvent en réponse à des stress imposés, tels que l'hypoxie et la privation de nutriments (Tracy et al. 2007). Dans le cancer, la mitophagie semble favoriser ou supprimer la tumeur selon le type de tumeur ou le stade de progression (Chourasia, Boland, and Macleod 2015; Biel and Rao 2018; Si et al. 2020).

Une signalisation redox dérégulée ou un dysfonctionnement mitochondrial peut influencer les activités mitophagiques. Cependant, le lien entre la mitophagie, la signalisation redox et le dysfonctionnement mitochondrial n'est pas clairement compris dans le cadre de la résistance à la DOX dans le cancer du sein.

L'objectif de cette étude était de déterminer si la mitophagie était activée dans les cellules cancéreuses mammaires résistantes à la DOX (MCF-7dox) en présence de la DOX et quels étaient les liens avec les ERO mitochondriaux et le fonctionnement énergétique mitochondrial.

Pour ceci, nous avons utilisé deux lignées cellulaires cancéreuses mammaires sensible (MCF-7) et résistante à la DOX (MCF-7dox). Nous avons déterminé les effets de la DOX sur la mitophagie en analysant, par microscopie à fluorescence, la formation des autophagolysosomes. Le rôle des ERO mitochondriaux a été évalué en utilisant le mitoTEMPO, un antioxydant mitochondrial. Le fonctionnement énergétique mitochondrial a notamment été étudié en analysant l'activité enzymatique et l'assemblage des complexes I, II, III et IV de la chaîne respiratoire (par spectrophotomètre et BN Page).

Article : Doxorubicin-induced autophagolysosome formation is partly prevented by mitochondrial ROS elimination in DOX-resistant breast cancer cells

Seyedeh Tayebbeh Ahmadpour^{1,*}, Valérie Desquirit-Dumas², Ulku Yikilmaz¹, Julie Dartier¹, Isabelle Domingo¹, Celine Wetterwald², Charlotte Orre², Naïg Gueguen², Lucie Brisson¹, Karine Mahéo¹ and Jean-François Dumas^{1,*}

¹ Affiliation 1; Université de Tours, Inserm, Nutrition, Croissance et Cancer UMR1069, 37032, Tours, France

² Affiliation 2; UMR CNRS 6214-INSERM U1083, Angers, France

st.ahmadpour@gmail.com ; VaDesquirit@chu-angers.fr; ulku.yikilmaz@etudiant.univ-rennes1.fr;

julie.dartier@gmail.com; isabelle.domingo@univ-tours.fr; sunja@hotmail.fr; charlotte.orre@etud.univ-angers.fr;

nagueguen@chu-angers.fr; lucie.brisson@univ-tours.fr; karine.maheo@univ-tours.fr; jean-francois.dumas@univ-tours.fr

* Correspondence 1: jean-francois.dumas@univ-tours.fr; Tel: +33 247 36 60 59, fax: +33 247 36 62 26

* Correspondence 2: st.ahmadpour@gmail.com

Abstract: Since its discovery, mitophagy has been viewed as a protective mechanism used by cancer cells to prevent the induction of mitochondrial apoptosis. Most cancer treatments directly or indirectly cause mitochondrial dysfunction in order to trigger signals for cell death. Elimination of these dysfunctional mitochondria by mitophagy could thus prevent the initiation of the apoptotic cascade. In breast cancer patients, resistance to doxorubicin (DOX), one of the most widely used cancer drugs, is an important cause of poor clinical outcome. However, the role played by mi-tophagy in the context of DOX-resistance in breast cancer cells is not well understood. We therefore, tried to determine whether increase in mitophagic flux was associated to the resistance of breast cancer cells to DOX. Our first objective was to explore whether DOX-resistant breast cancer cells were characterized by conditions that favor mitophagy induction. We next tried to determine whether mitophagic flux was increased in DOX-resistant cells in response to DOX treatment. To this purpose, the parental (MCF-7) and DOX-resistant (MCF-7dox) breast cancer cell lines were used. Our results show that mitochondrial ROS production and HIF-1 alpha expression are higher in MCF-7dox in basal condition compared to MCF-7, suggesting DOX-resistant breast cancer cells are prone to stimuli to induce mitophagy-related event. Our results also showed that, in response to DOX, autophagolysosome formation is induced in DOX-resistant breast cancer cells. This mitophagic step following DOX treatment seems to be partly due to mitochondrial ROS production as autophagolysosome formation is moderately decreased by the mitochondrial antioxidant mitoTEMPO.

Keywords: Mitochondria; Mitophagy; Breast cancer; Reactive oxygen species; Doxorubicin

1. Introduction

Mitophagy is a selective form of autophagy in which damaged or excessive mitochondria are degraded, frequently in response to imposed stresses, such as hypoxia and nutrient deprivation [1]. In cancer, mitophagy appears to be tumor-promoting or tumor-suppressive depending on tumor type or stage of progression. Indeed, preserving a basal level of mitophagy facilitates cell survival but excessive mitophagy may activate apoptosis pathways [2]. For instance, in breast cancer, the most commonly diagnosed cancer in women worldwide, it has been shown that reduced/defective mitophagy promoted tumor growth and metastasis and predicted poor metastasis-free survival [3], [4]. On the contrary, data showed that activation of mitophagy reduced drug-induced apoptosis in breast cancer cells suggesting that once a tumor has progressed to an advanced stage, mitophagy may mitigate the treatment-induced stress and participate to chemoresistance of cancer cells [5], [6].

Doxorubicin (DOX) belongs to the group of anthracyclines which are very effective chemotherapeutic agents used in the treatment of a wide range of malignant tumors. In the treatment of breast carcinoma, DOX is one of the most effective drugs in early and late-stage tumors [7]. Several enzymes, including cytochrome P450 reductase, mitochondrial complex 1, and xanthine oxidoreductase, have been shown to reduce DOX via a one-electron reduction mechanism, giving rise to the semiquinone intermediate which can rapidly reduce oxygen to superoxide ($O_2 \bullet^-$). The redox activation of DOX in $O_2 \bullet^-$, hydrogen peroxide (H_2O_2) and the formation of iron-catalyzed hydroxyl radicals has been suggested as the mechanism of DOX-induced cytotoxicity [8]. ROS can also induce mitochondrial damage and mitophagy [9]–[11]. There is now compelling evidence that ROS play an important role in the regulation of hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) under normoxia and hypoxia [12]. On the other hand, HIF-1 alpha has been shown to induce mitophagy [13]. Some studies suggest that activation of mitophagy leads to resistance to DOX treatment. For instance, NIX-mediated mitophagy results in doxorubicin resistance in HCT8 colorectal cancer cells [14]. Interestingly, a combination of DOX and liensinine increases the anti-cancer effect of DOX. This is based on the observation that DOX-mediated apoptosis may be further promoted by liensinine, which inhibits mitophagy by preventing fusion of the autophagosome with the lysosome [15]. Other studies suggest that inhibition of mitophagy could play a key role in preventing breast cancer incidence [16], [17]. The flavonoid TL-2–8 has been shown to prevent breast cancer by blocking mitophagy. Thus, TL-2–8 by blocking the fusion of the mitophagosome with the lysosome improved the survival of mice carrying breast cancer xenografts [17]. Fructose-1,6-bisphosphatase (FBP1), an enzyme limiting the rate of glyconeogenesis, is generally considered to be a suppressor of breast cancer. FBP1 has been shown to induce apoptosis in human breast cancer cells by inhibiting HIF-1 α /

BNIP3-mediated mitophagy [16]. However, the crosstalk between mitophagy, redox signaling and HIF-1 α is not well understood in the context of DOX-resistance in breast cancer cells.

The objective of this study was therefore to determine whether the resistance of breast cancer cells to DOX was associated to conditions that favor mitophagy induction. We particularly investigated ROS production and HIF-1 α expression and the response of mitophagy to DOX treatment in a DOX-resistant breast cancer cell line model.

2. Materials and Methods

2.1. Cell culture

MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) and MCF-7dox cells (DOX resistant cells with an IC₅₀ approximately 500 times greater than that of MCF-7 cells) (MCF-7dox line was a gift of Dr. K. Cowan (National Cancer Institute, Bethesda, MD) were cultured in DMEM medium 4.5 g/L of glucose (Lonza) supplemented with 5% FBS (Eurobio). The cells were cultured at 37°C with 5% CO₂. The MCF-7dox cells were cultured in the presence of 1 μ M of DOX in order to maintain their resistance. Before the experiments, DOX was withdrawn for 7 days.

2.2. Protein extraction

The cell pellets were solubilized in lysis buffer (1% triton, 20 mM Tris base, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) supplemented with protease inhibitor (Protease In-hibitor Cocktail, Sigma, France). Samples were then incubated on ice for ten minutes followed by centrifugation at 11,000 x g at 4°C. The supernatant containing protein ex-tracts was collected and the proteins were quantified using BCA Protein Assay Reagent Kit (Life Technologies).

2.3. Electrophoresis assay and western blotting

Protein extract were diluted in water, loading buffer (ThermoFisher Scientific, Pierce) as well as NuPAGE 10X reducing and denaturing agent containing 500 mM di-thiothreitol (DTT) (Thermo Scientific, Pierce). Proteins were separated on a 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gel (Bio-Rad). The transfer was carried out under semi-dry conditions (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad) using a PVDF membrane. The proteins of interest were detected by overnight incubation with the primary specific antibodies at 4°C under shaking condition. Antibodies used for ex-periments are as follows; anti-BNIP3 (44060S), anti-NIX (D4R4B), anti-TOMM20 (4272S), anti-Hif-1 α (D1S7W) and anti-VDAC-1 (ab34726, abcam). All primary antibodies are purchased from Cell Signaling except VDAC-1. Next day, the membranes were washed twice with TBS 0,1% Tween and then incubated with secondary antibody (Santa Cruz BioTechnology) for 1 hours at room temperature. The primary

antibody solutions are diluted in TBS-Tween containing 4% BSA and those of secondary antibody in TBS-Tween containing 0.5% BSA. Finally, the membranes are washed three times for 5 minutes with TBS 0.1% Tween and bands were revealed using the Pierce ECL kit (ThermoFisher scientific). β -actin was used as internal loading control (β -actin-HRP santa cruz). The images were taken using ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

2.4. Fluorescence microscopy

Mitophagy was studied by measuring the colocalization of mitochondria and lysosomes (autophagolysosome formation). Mitochondria were stained with MitoTrack-erTM Green FM dye (m7514, Thermofischer) at a concentration of 100 nM. The staining of lysosomes was performed by using the 60 nM of LysoTrackerTM Red DND99 (Invitro-gen). Images were observed using fluorescence microscopy (Nikon eclipse Ti, Okolab) and Nikon's NIS-Elements microscope imaging software. Pearson's correlation coefficient (r) has been used for quantifying colocalization using the JACOP plugin for ImageJ. Mitophagy was studied following treatments with 30 μ M DOX (Sigma) for 72 hours or the combination of DOX and 1 μ M mitoTEMPO (Sigma) for 24h.

2.5. 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 post-fixed 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 section. This was repeated 4 times.

2.6. 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 (C1), succinate ubiquinone reductase (C2), ubiquinol cytochrome C reductase (C3),

cytochrome C oxidase (C4) and citrate synthase (CS) were measured according to standard methods [16].

2.7. Assembly of mitochondrial respiratory chain complexes and supercomplexes

Complex I assembly was analyzed by Blue Native electrophoresis (BN Page) according to [17]. 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 50 µg 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 1, SDHA for complex 2 (used as loading reference), III core 2 for complex 3 and COX Va for complex 4 (1/1000e, Abcam) and bands were revealed by chemiluminescence on an Odyssey apparatus (Li-Cor Biosciences). For supercomplexes detection, the same pro-tocol was applied except to larylmatoside solubilization which was replaced with dig-itonin (3g/g of proteins).

2.8. ROS production

ROS production was studied via a novel approach of combining high-resolution respirometry using a 2-mL chamber OROBOROS Oxygraph 2K (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) and fluorometric measurement of hydrogen peroxide (H₂O₂) production as previously described [18]. Briefly, the production of H₂O₂ was evaluated by measuring the hydrogen peroxide-induced fluorescence of 1 µM 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 stirring. For simultaneous measurement of oxygen and H₂O₂ fluxes, cells (5x10⁶) were permeabilized by digitonin (8 µg per 10⁶ cells for MCF-7 and 10 µg per 10⁶ cells for MCF-7dox). Permeabilized cells 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). Experiment was carried out in the presence of glutamate (5 mM) and malate (5 mM) for complex I-driven mitochondrial oxygen consumption. The H₂O₂/O₂ flux ratio is applied to evaluate the relative importance of H₂O₂ production at different respiratory states.

2.9. Glucose and lactate assay

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, Ire-land) 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.

2.10. Citrate synthase activity on mitochondrial extracts

Citrate synthase activity was measured by using the coupled reaction as follows: Acetyl-CoA+oxaloacetate+H₂O → citrate+CoA-SH (colorimetric reaction: CoA-SH+DTNB → TNB+CoA-S-S-TNB). Citrate synthase activity was determined by measuring the appearance of the yellow product (TNB), which absorbed at 412 nm. The reaction medium consisted of 0.1 mM DTNB, 4% Triton X-100, 0.6 mM acetyl CoA, and mitochondrial proteins samples (10 µg). Twenty microliters of oxalacetate (10 mM) were added to start the reaction. The absorbance changes were measured every 20 seconds over 3 min at 412 nm to determine the citrate synthase activity. All assays were carried out at 37°C. Activity of citrate synthase expressed as nmol/ (min*million of cells).

2.11. Gene expression analysis

Gene expression was measured on 4 RNA extracts from MCF7 and MCF7-dox cell pellets using the Ion AmpliSeq™ Transcriptome Human Gene Expression Kit (ThermoFisher scientific) according to the manufacturer protocol. Briefly, cDNA was synthesized from 10 ng of total RNA using the SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher scientific). Up to 20,000 genes were amplified with a single multiplexed targeted AmpliSeq panel (Ion AmpliSeq™ Human Gene Expression Core Panel, ThermoFisher scientific). After ligation of adaptors and barcodes, libraries were loaded on Ion 540™ Chips using a Ion Chef™ apparatus (ThermoFisher scientific). Libraries were sequenced on the Ion GeneStudio S5 Next Generation Sequencer and gene count was realized thanks to the ampliSeqRNA pipeline from Ion Torrent Suite (ThermoFisher scientific). Enrichment and differential expression analysis were performed with the IDEP 9.1 workflow (<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep/>) using the DESEQ2 package for differentially expressed genes determination.

2.12. Mitochondrial DNA content analysis

mtDNA copy number was measured in MCF-7 and MCF-7dox as described [19]. Briefly, total DNA was extracted from frozen cell pellets and two mitochondrial genes (ND4 and COX1) were amplified by quantitative PCR. The Ct values were determined and compared to a standard curve with known mtDNA copy number (from 10⁷ to 10³). The results were

normalized with the amount of two nuclear genes (betazmicroglobulin and glycerol 3 phosphate dehydrogenase) to obtain the mtDNA copy number per cell.

2.13. Statistical analysis

Results were expressed as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed using graphPad Prism. Significance between groups was determined by one-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test or by Mann-Whitney test for two groups and Kruskal-Wallis for multiple comparisons. $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Increased glycolysis and dysfunctional mitochondria in DOX-resistant breast cancer cells.

We analyzed the capacity of the respiratory chain complexes, by measuring the maximal enzymatic activities of respiratory chain complexes, in MCF-7 and MCF7-dox cells. Activities of complex I and complex IV were $\sim 50\%$ lower in MCF-7dox compared to MCF-7 (Figure 1a). By contrast, activity of complex II was higher (2.5-fold). No change of complex III was observed (**Figure 29a**). We next analyzed the effects of these changes on the functionality of respiratory chain by measuring substrate-driven mitochondria oxygen consumption in digitonin-permeabilized cells under ATP synthesis condition. Compared to MCF-7, mitochondrial oxygen consumption in MCF-7dox with complex I- (glutamate/malate; -33%), complex II- (succinate; -52%) or complex IV-linked substrate (TMPD/ascorbate; -44%) (**Figure 29b**) was reduced emphasizing a strong impact of complex I and complex IV dysfunction in MCF7-dox oxidative metabolism. Interestingly, we also evidenced a structural impairment of respiratory chain complexes in MCF7-dox cells. Indeed, blue native PAGE analysis revealed a significant reduction of the quantity of complex I and complex IV holoenzyme (correctly assembled complex) in MCF-7dox compared to MCF-7 (-71% and -60% respectively) (**Figure 29c**). However, no assembly intermediates (testifying to a complex subunits assembly defect) could be evidenced in MCF-7dox cells. It is now well admitted that the correct functioning of the respiratory chain required the assembly of complexes into supercomplexes structures. In MCF7-dox, the quantity of supercomplexes I+III₂+IV was also reduced compared to MCF-7 (-76%) (**Figure 29d**). Collectively, these data indicated that oxidative metabolism was altered in MCF-7dox. On the other hand, we found that the ratio of lactate production/glucose consumption was higher (+60%) in MCF-7dox than in MCF-7 (**Figure 29e**) suggesting that MCF-7dox cells had a predominant glycolytic metabolism.

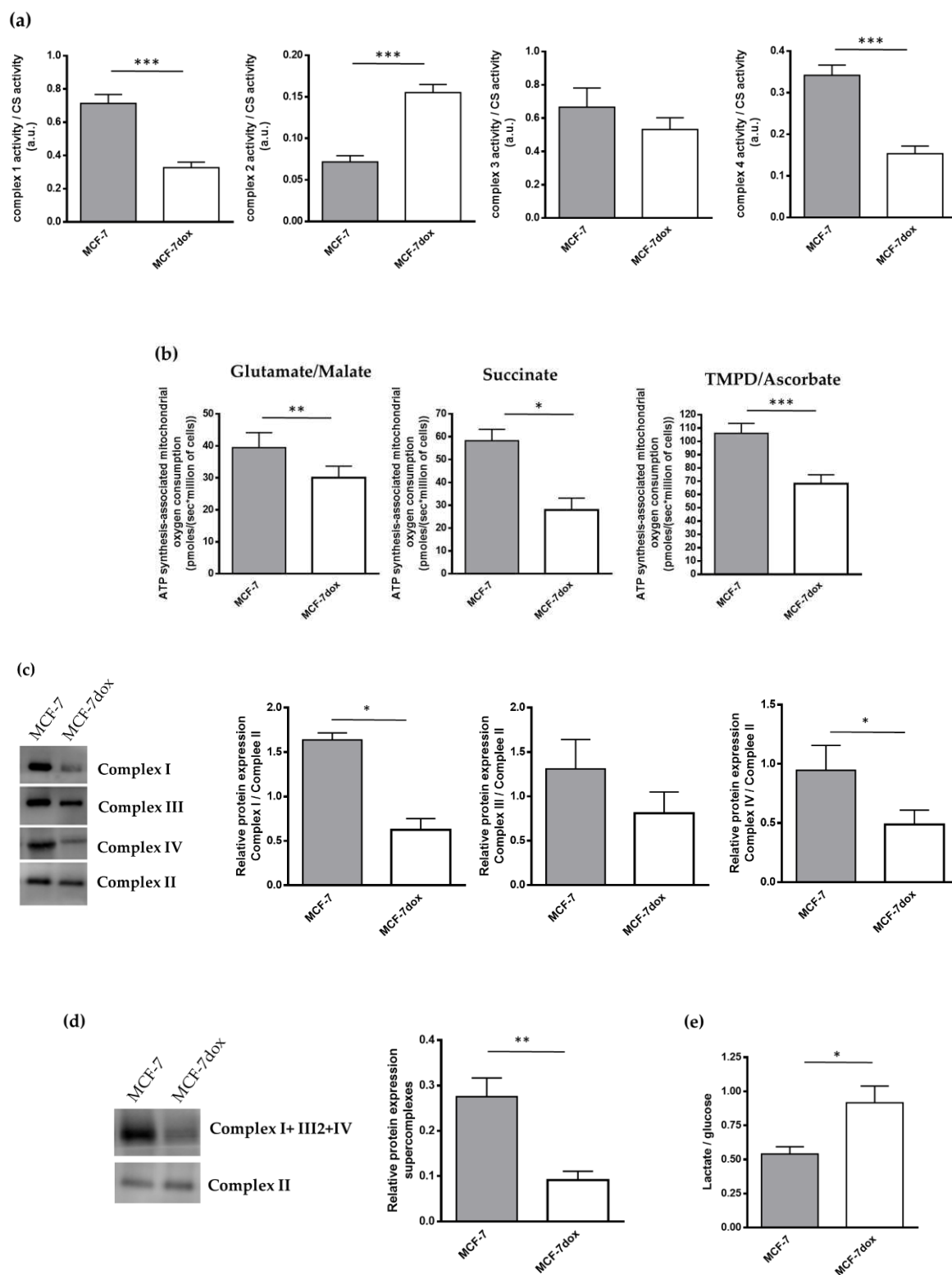


Figure 29. Increased glycolysis and dysfunctional mitochondria in DOX-resistant breast cancer cells.

(a) Enzymatic activities of respiratory chain complexes 1, 2, 3 or 4 and citrate synthase were measured by spectrophotometry. Results are presented as the ratio of respiratory chain complexes activity to citrate synthase activity (n = 6); (b) Mitochondrial oxygen consumption was measured by high-resolution respirometry. Experiment was carried out in the presence of glutamate + malate (complex I, n=5), succinate (complex II, n=6) or TMPD + ascorbate (complex IV, n=9) and ADP as substrates; (c) Holoenzyme for mitochondrial complex 1, 2, 3 et 4 were analyzed by BN Page. Results are presented as the ratios of complex 1, 3 or 4 holoenzyme content to complex 2 holoenzyme content (n = 6); (d) Respiratory chain supercomplexes assembly was determined by Blue Native Page. Results were expressed as a ratio to complex II amount.; (e) The level of lactate production and glucose consumption were measured by spectrophotometry. Results are presented as the ratio of lactate production to glucose consumption (n = 21). The data are presented as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

3.2. ROS production is increased and is associated to a higher expression of hypoxia inducible factor-1 in DOX-resistant breast cancer cells.

It is expected that alterations of mitochondrial oxidative metabolism are associated to ROS overproduction [19]. Our results showed that ROS production with respiratory chain complex I substrates was higher (x4) in mitochondria from MCF-7dox than in mitochondria from MCF-7 (**Figure 30a**). On the other hand, expression levels of mitochondrial antioxidant genes were higher in MCF-7dox than in MCF-7 (**Figure 30b**). It has been suggested that ROS play an important role in regulating the master transcription factor, hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) [20], [21]. Our data showed that HIF-1 alpha was higher at both mRNA and protein level in MCF-7dox than in MCF-7 in normoxia conditions (**Figure 30c and Figure 30d**). Both BNIP3 and NIX are under the transcriptional regulation of HIF-1 alpha. Protein levels of both BNIP3 and NIX were higher in MCF-7dox than in MCF-7 (**Figure 30e**). In addition, mRNA levels of BNIP3 and NIX were also higher in MCF-7dox than in MCF-7 (**Figure 30c**). As expected, pretreatment of cells with CoCl₂, a canonical hypoxia-mimetic agent known to stabilize HIF1 α protein, was able to stimulate BNIP3 and NIX protein levels only in MCF-7dox (**Figure 30e**).

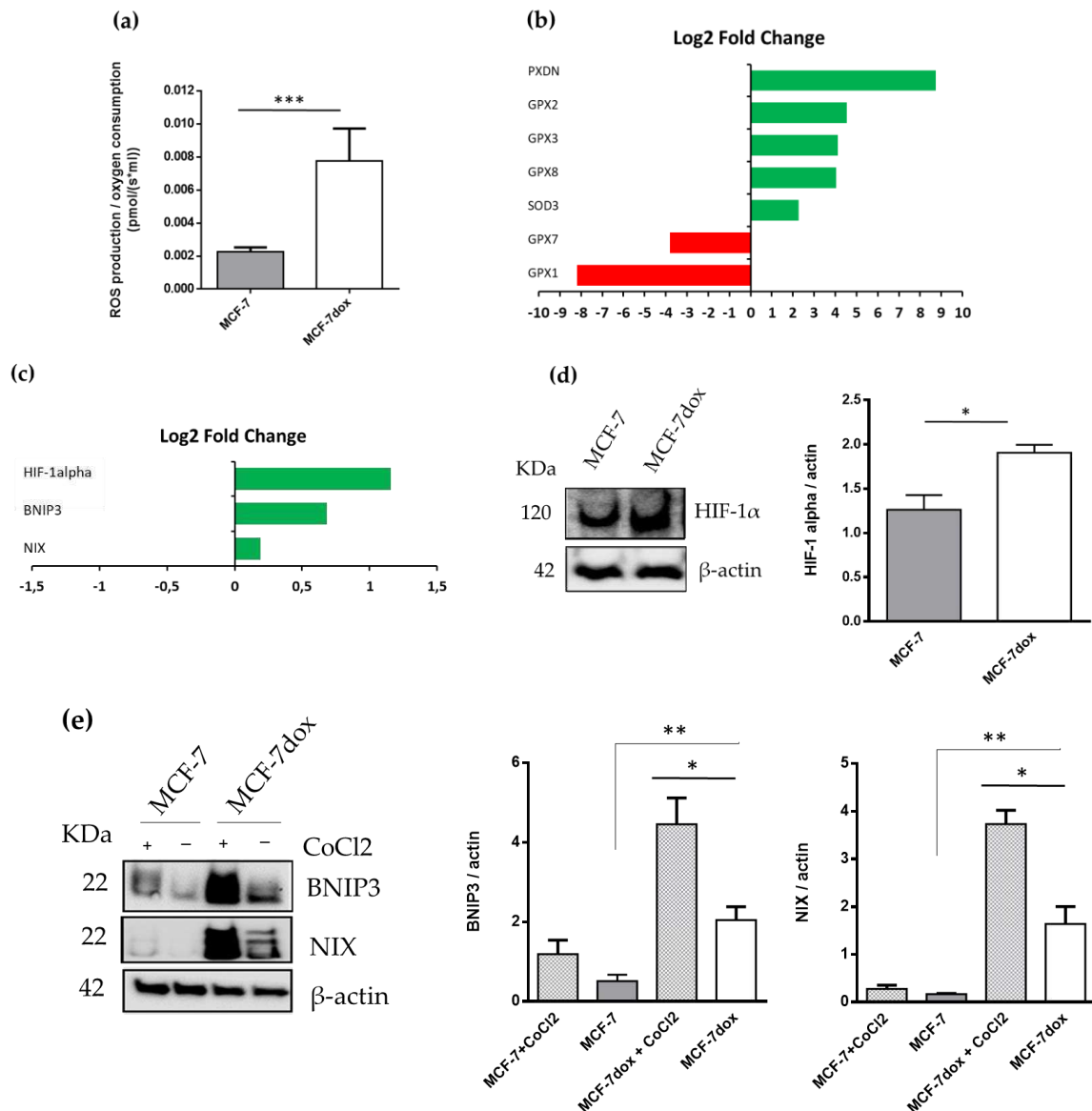


Figure 30. Mitochondrial ROS production is increased and is associated to a higher expression of hypoxia inducible factor-1 in DOX-resistant breast cancer cells. (a) Mitochondrial ROS production was evaluated simultaneously with mitochondrial oxygen consumption by measuring the hydrogen peroxide-induced fluorescence of Amplex Red. Mitochondrial oxygen consumption was measured by high-resolution respirometry. Experiment was carried out in the presence of glutamate, malate and ADP (n = 7); (b) and (c) Gene expression analysis. Results are represented as Log2 Fold Change of MCF-7dox compared to MCF-7; (d) The level of HIF-1α and actin were measured by western blotting with specific antibodies. Densitometric analysis results are presented as the ratio of HIF-1α level to actin level (n = 4); (e) The level of BNIP3, NIX and actin were measured by western blotting with specific antibodies. CoCl2 treated cells were used as positive control for protein expression. Densitometric analysis results are presented as the ratios of BNIP3 and NIX levels to actin levels (n ≥ 5). The data are presented as mean ± SEM. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005.

3.3. In basal condition, there is no difference in mitophagy between the parental and the DOX-resistant breast cancer cell line.

We have next studied whether the increased protein levels of BNIP3 and NIX was associated to an induction of mitophagy in MCF-7dox. Active mitophagy is associated to decrease in mitochondria content. Results showed that the number of mitochondria as measured by transmission electron microscopy was unchanged between MCF-7 and MCF-7dox (**Figure 31a**). No difference in the mitochondrial DNA content (mtDNA) and maximal activity of citrate synthase, other indicators of mitochondrial mass, was detected (**Figure 31b** and **Figure 31c**). Furthermore, protein levels of TOMM20, a constitutively expressed outer membrane mitochondrial protein, was unchanged between the two cell lines (**Figure 31d**). Only, expression of VDAC-1 was lower in MCF-7dox than MCF-7 (**Figure 31d**). Collectively, these data suggested that mitochondrial mass was not different between MCF-7 and MCF-7dox and increased level of mitophagy proteins is not associated to difference in mitophagy between the two cell lines in basal condition.

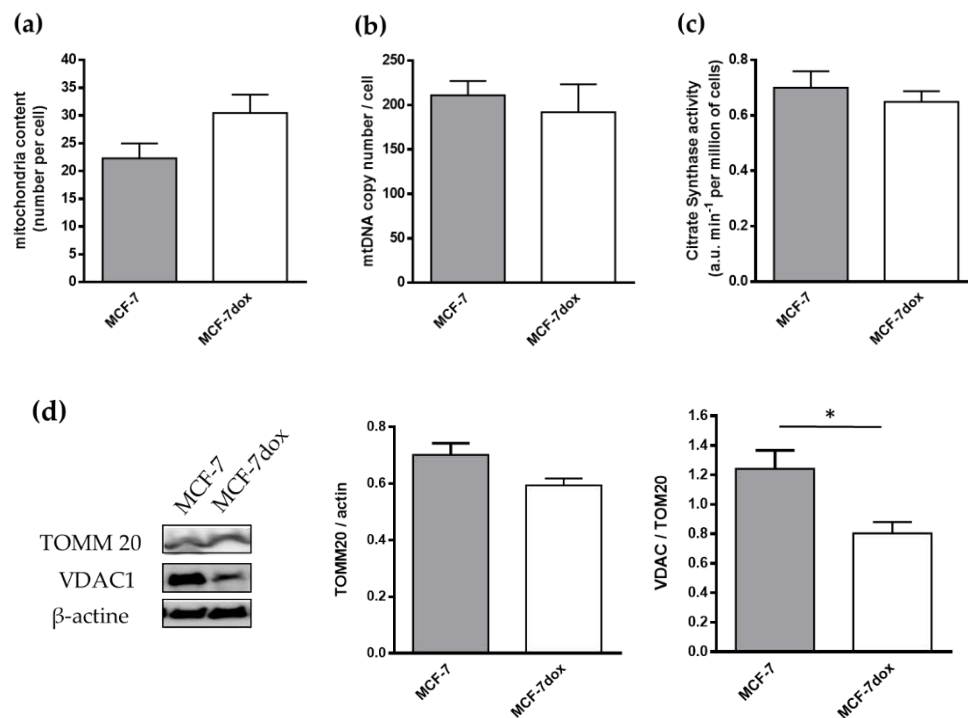


Figure 31. In basal condition, there is no difference in mitophagy between the parental and the DOX-resistant breast cancer cell line. (a) Mitochondrial number was determined by transmission electron microscopy (n = 4, 10 cells/n); (b) mitochondrial DNA copy number was determined by quantitative PCR (n=6); (c) Maximal enzymatic activity of citrate synthase activity was measured by spectrophotometry (n=6); (d) The level of TOMM20 and VDAC-1 were measured by western blotting with specific antibodies. Densitometric analysis results are presented as the ratio of TOMM20 and VDAC-1 level to actin level (n = 5). The data are presented as mean ± SEM. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005.

3.4. Autophagolysosome formation is activated by DOX treatment in DOX-resistant breast cancer cells

We have next studied mitophagic flux in MCF-7dox in response to DOX treatment by determining the colocalization of mitochondria within lysosomes (autophagolysosome formation). Mitochondria were labeled with MTG (green fluorescence) and lysosomes were labeled with red fluorescence. Mitochondrial and lysosomal colocalization was indicated by yellow fluorescence. Our results showed that the lysosomal staining intensity and especially the number of lysosomes colocalized with fragmented mitochondria were increased by DOX treatment in DOX-resistant breast cancer cells (MCF-7dox) while no effect of DOX was observed in MCF-7 parental cells (**Figure 32a**). Thus, colocalization of mitochondria with lysosomes was strongly increased by DOX treatment in MCF-7dox (**Figure 32a**). Interestingly, pretreatment of MCF-7dox cells with the mitochondria-targeted antioxidant mitoTEMPO slightly reduced (-20%) DOX-induced colocalization of mitochondria with lysosomes (**Figure 32b**) suggesting that elimination of mitochondrial ROS can partly prevent mitophagy initiation. Collectively, these results suggested that autophagolysosome formation is induced by DOX treatment in MCF-7dox and this effect is partly dependent of the increase in mitochondrial ROS level following DOX treatment.

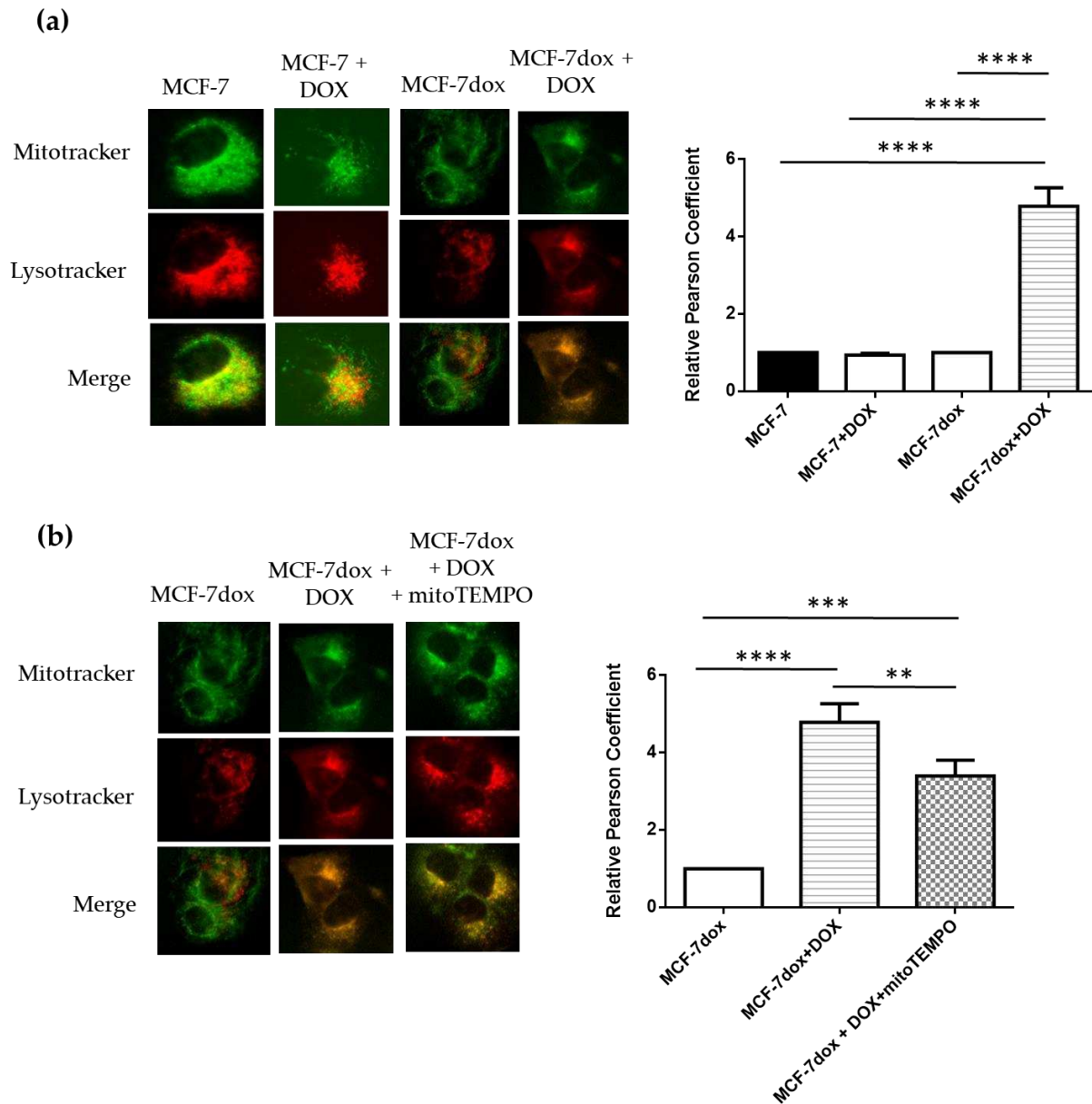


Figure 32. Autophagolysosome formation is activated by DOX treatment in DOX-resistant breast cancer cells. (a and b) Representative images of colocalization of lysosomes and mitochondria in MCF-7 and MCF-7dox. Cells were co-stained with 60 nM MitoTracker Green and 100 nM LysoTracker Red for 45 min. Images of cells were acquired with a fluorescence microscopy (Nikon eclipse Ti, Okolab) and Nikon's NIS-Elements microscope imaging software. MCF-7 and MCF-7dox were treated with 100 nM and 30 μ M respectively (IC_{50} for each cell line) of doxorubicin and 5 μ M mitoTEMPO 24 hours before the experiment; (b) The colocalization of lysosomes and mitochondria was calculated using image-J software and Pearson's correlation coefficient (r) has been applied for quantifying colocalization. 32-49 cells from 5 independent experiments. The data are presented as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

4. Discussion

In the present study, we report that DOX resistance in breast cancer cells is associated to an activation of autophagolysosome formation in response to DOX treatment. This effect is moderately ascribed to mitochondrial ROS production since induction of autophagolysosome formation is slightly diminished by the mitochondrial antioxidant mitoTEMPO. In addition, it seems that DOX-resistant breast cancer cells are prone to stimuli to initiate mitophagy since mitochondrial ROS production and HIF-1 alpha expression are higher in these cells in basal condition.

DOX resistance is an important cause of poor clinical outcome in breast cancer patients. In the present study, we found that mitophagy was initiated by DOX treatment in a resistant breast cell line model (MCF-7dox). This result suggests that mitophagy may mitigate the treatment-induced stress and participate to DOX resistance of MCF-7dox. It has already been shown that activation of mitophagy could induce resistance to DOX in HCT8 colorectal cancer cells [14]. In addition, in DOX-sensitive breast cancer cell line models, DOX-mediated apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy/mitophagy with liensinine [15]. In the present study, we have specifically studied mitophagy by analyzing the colocalization of mitochondria/lysosomes. Interestingly, we also showed that DOX-induced accumulation of lysosomes within mitochondria was slightly attenuated by co-treatment with the mitochondrial antioxidant mitoTEMPO. It seems therefore that induction of mitophagy by DOX treatment is partly mediated by mitochondrial ROS. DOX is a redox active compound that can react with several enzymes including mitochondrial complex I to generate semiquinone radical and high levels of ROS [8]. Collectively, our data suggest that mitophagy is induced in MCF-7dox via mitochondrial ROS-dependent mechanisms and could partly participate to DOX resistance in these cells. Further experiments on the different ways of mitophagy and the effects of mitochondrial ROS are required to connect mitophagy and DOX-resistance and ROS in breast cancer cells.

Another important finding in the present study is that mitochondrial ROS production and HIF-1 alpha protein level were higher in MCF-7dox than in their DOX-sensitive counterparts (MCF-7) in basal conditions. Additionally, the level of antioxidant enzymes such as GPX2, GPX3 and SOD3 are higher in MCF-7dox compared to MCF-7 cell lines, likely, to counteract the increased level of ROS that are produced by MCF-7dox thus preventing oxidative stress. ROS excess can induce the accumulation of defective mitochondria and in turn, mitophagy to eliminate these dysfunctional mitochondria and thus prevent the initiation of the apoptotic cascade. In our MCF-7dox resistant cells, the increased level of ROS is associated to alteration of mitochondria function as evidenced by decreased activity of complex

I and a decreased quantity of supercomplexes composed by complexes I, III and IV. In addition, we found that MCF-7dox had a particular metabolic phenotype since glycolysis was increased. Surprisingly, our results showed that, in basal condition, mitochondrial mass is not different between MCF-7 and MCF-7dox as evidenced by electron microscopy, citrate synthase activity and protein content of mitochondrial biogenesis indicator, suggesting that mitophagy is not active in basal condition. It is therefore not excluding that the default in mitochondrial oxidative phosphorylation we observed in MCF-7dox were not sufficient to signal for mitophagic clearance. Interestingly, we found that expression of HIF-1 alpha and BNIP3, a downstream regulator of HIF-1 alpha in hypoxia, is higher in MCF-7dox than in MCF-7. It is known that ROS play an important role in the regulation of HIF-1 alpha under normoxia and hypoxia [12]. In turn, HIF-1 alpha has been shown to induce mitophagy [13]. It seems therefore that increased level of ROS and HIF-1 alpha in our MCF-7dox cells is not sufficient to stimulate mitophagy activation. However, the relationship between HIF-1 alpha, mitophagy and ROS may be complex since a previous study have demonstrated that loss of BNIP3 led to increased HIF-1 alpha levels and ROS production and conversely expression of exogenous BNIP3 markedly reduced HIF-1 alpha accumulation and led to mitophagy [24]. On the other hand, HIF-1 alpha is known to promote the metabolic switch and favor glycolysis [25], [26]. Collectively, our data suggest a metabolic adaptation in MCF-7dox in order to induce resistance to DOX treatment. Both the higher mitochondrial ROS production and HIF-1 alpha expression allow MCF-7dox to be prone to mitophagy induction. While our results propose a role for ROS and HIF-1 alpha in DOX-induced mitophagy, they do not provide the mechanism of DOX-induced mitophagy in DOX-resistant breast cancer cells. In this respect, experiments to study the effects of DOX treatment on the production of mitochondrial ROS and the activity of HIF-1 alpha as well as experiments to demonstrate causal effect are required to clearly elucidate the mechanisms that are responsible for both mitophagy activation and DOX resistance of breast cancer cells.

5. Conclusions

In conclusion, in this study, we have found 1) DOX resistance in breast cancer cells is associated to an activation of autophagolysosome formation in response to DOX treatment, 2) this effect is moderately ascribed to mitochondrial ROS production, 3) DOX-resistant breast cancer cells seem to be prone to stimuli to induce mitophagy since mitochondrial ROS production and HIF-1 alpha expression are higher in these cells in basal condition. Overall, our findings provide a potential rationale for approaching mitophagy induction as potential biomarker to monitor resistance of breast cancer cells to DOX.

Author Contributions: Conceptualization, J.F.D. and S.T.A.; methodology, S.T.A, V.D.D, C.O, J.D., I.D, CW, N.G. and U.Y.; validation, J.F.D., L.B., K.M. and V.D.D; formal analysis,

S.T.A., J.F.D., V.D.D., L.B. and N.G.; writing—original draft preparation, J.F.D. and S.T.A.; writing—review and editing, L.B., S.T.A., V.D.D., K.M. and J.F.D.; funding acquisition, J.F.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Funding: This research was funded by the “Ligue Nationale Contre le Cancer” (comités 28, 37, 41, 53, 85), by the “Canceropole Grand Ouest” (CONCERTO, régions Centre-Val de Loire, Pays de Loire et Bretagne) and by the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer”. S.T.A. was supported by “Université de Tours”.

Data Availability Statement: The data is presented in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ATP: Adenosine triphosphate

BNIP3(L): BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (Like)

DOX: Doxorubicin

HIF-1 alpha: Hypoxia inducible factor-1 alpha

OXPHOS: Oxidative phosphorylation

PINK1; PTEN-induced kinase 1

ROS: Reactive oxygen species

TOMM20: Translocase of outer mitochondrial membrane 20

VDAC-1: Voltage-dependent anion-selective channel 1

References

1. K. Tracy, B. C. Dibling, B. T. Spike, J. R. Knabb, P. Schumacker, and K. F. Macleod, ‘BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy’, *Mol. Cell Biol.*, vol. 27, no. 17, pp. 6229–6242, Sep. 2007, doi: 10.1128/MCB.02246-06.
2. F. Ferro, S. Servais, P. Besson, S. Roger, J.-F. Dumas, and L. Brisson, ‘Autophagy and mitophagy in cancer metabolic remodelling’, *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 98, pp. 129–138, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.semcdb.2019.05.029.
3. H. Chourasia, M. L. Boland, and K. F. Macleod, ‘Mitophagy and cancer’, *Cancer Metab.*, vol. 3, p. 4, 2015, doi: 10.1186/s40170-015-0130-8.
4. R. Deng et al., ‘MAPK1/3 kinase-dependent ULK1 degradation attenuates mitophagy and promotes breast cancer bone metastasis’, *Autophagy*, pp. 1–19, Dec. 2020, doi: 10.1080/15548627.2020.1850609.
5. T. G. Biel and V. A. Rao, ‘Mitochondrial dysfunction activates lysosomal-dependent mitophagy selectively in cancer cells’, *Oncotarget*, vol. 9, no. 1, pp. 995–1011, Jan. 2018, doi: 10.18632/oncotarget.23171.
6. L. Si et al., ‘Silibinin-induced mitochondria fission leads to mitophagy, which attenuates silibinin-induced apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 cells’, *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 685, p. 108284, May 2020, doi: 10.1016/j.abb.2020.108284.

7. K. Renu, A. V.g., T. P. P.b., and S. Arunachalam, 'Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update', *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 818, pp. 241–253, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.ejphar.2017.10.043.
8. J. M. Berthiaume and K. B. Wallace, 'Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity', *Cell Biol. Toxi-col.*, vol. 23, no. 1, pp. 15–25, Jan. 2007, doi: 10.1007/s10565-006-0140-y.
9. R. K. Dagda, S. J. Cherra, S. M. Kulich, A. Tandon, D. Park, and C. T. Chu, 'Loss of PINK1 Function Promotes Mi-tophagy through Effects on Oxidative Stress and Mitochondrial Fission*', *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 20, pp. 13843–13855, May 2009, doi: 10.1074/jbc.M808515200.
10. E. H. Kim et al., 'Sodium Selenite Induces Superoxide-Mediated Mitochondrial Damage and Subsequent Au-tophagic Cell Death in Malignant Glioma Cells', *Cancer Res.*, vol. 67, no. 13, pp. 6314–6324, Jul. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4217.
11. R. Scherz-Shouval and Z. Elazar, 'Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology', *Trends Biochem. Sci.*, vol. 36, no. 1, pp. 30–38, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.tibs.2010.07.007.
12. T. Kietzmann and A. Görlach, 'Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression', *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 16, no. 4–5, pp. 474–486, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.semcdb.2005.03.010.
13. S. Castelli, F. Ciccarone, D. Tavian, and M. R. Ciriolo, 'ROS-dependent HIF1 α activation under forced lipid ca-tabolism entails glycolysis and mitophagy as mediators of higher proliferation rate in cervical cancer cells', *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR*, vol. 40, no. 1, p. 94, Mar. 2021, doi: 10.1186/s13046-021-01887-w.
14. C. Yan et al., 'Doxorubicin-induced mitophagy contributes to drug resistance in cancer stem cells from HCT8 human colorectal cancer cells', *Cancer Lett.*, vol. 388, pp. 34–42, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.canlet.2016.11.018.
15. J. Zhou et al., 'A novel autophagy/mitophagy inhibitor liensinine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy through DNMT1-mediated mitochondrial fission', *Autophagy*, vol. 11, no. 8, pp. 1259–1279, Aug. 2015, doi: 10.1080/15548627.2015.1056970.
16. F. Medja et al., 'Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis', *Mitochondrion*, vol. 9, no. 5, pp. 331–339, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.mito.2009.05.001.
17. G. Leman et al., 'Assembly defects induce oxidative stress in inherited mitochondrial complex I deficiency', *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 65, pp. 91–103, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.biocel.2015.05.017.
18. M. Makrecka-Kuka, G. Krumschnabel, and E. Gnaiger, 'High-Resolution Respirometry for Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria', *Biomolecules*, vol. 5, no. 3, pp. 1319–1338, Jun. 2015, doi: 10.3390/biom5031319.
19. V. Desquirit-Dumas et al., 'Warburg-like effect is a hallmark of complex I assembly defects', *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, vol. 1865, no. 9, pp. 2475–2489, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.bbadis.2019.05.011.
20. N. Seebacher, D. J. R. Lane, D. R. Richardson, and P. J. Jansson, 'Turning the gun on cancer: Utilizing lysosomal P-glycoprotein as a new strategy to overcome multi-drug resistance', *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 96, pp. 432–445, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.201.
21. L. Milane, Z. Duan, and M. Amiji, 'Role of hypoxia and glycolysis in the development of multi-drug resistance in human tumor cells and the establishment of an orthotopic

- multi-drug resistant tumor model in nude mice using hypoxic pre-conditioning', *Cancer Cell Int.*, vol. 11, no. 1, p. 3, Feb. 2011, doi: 10.1186/1475-2867-11-3.
22. E. Cadenas and K. J. Davies, 'Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging', *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 29, no. 3–4, pp. 222–230, Aug. 2000, doi: 10.1016/s0891-5849(00)00317-8.
23. I. Lopez-Fabuel et al., 'Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 46, pp. 13063–13068, 15 2016, doi: 10.1073/pnas.1613701113.
24. A. H. Chourasia et al., 'Mitophagy defects arising from BNip3 loss promote mammary tumor progression to metastasis', *EMBO Rep.*, vol. 16, no. 9, pp. 1145–1163, Sep. 2015, doi: 10.15252/embr.201540759.
25. S. E. Corcoran and L. A. J. O'Neill, 'HIF1 α and metabolic reprogramming in inflammation', *J. Clin. Invest.*, vol. 126, no. 10, pp. 3699–3707, Oct. 2016, doi: 10.1172/JCI84431.
26. G. L. Semenza, 'HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations', *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 9, pp. 3664–3671, Sep. 2013, doi: 10.1172/JCI67230.

RESULTATS PARTIE II

Etude du métabolisme des cardiolipines et de la tafazzin dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses mammaires à la doxorubicine

Introduction

En tant que signature phospholipidique des mitochondries, la CL joue un rôle clé dans la stabilité et l'intégrité de la structure et de la fonction mitochondriales. Les CL interagissent avec les protéines de la membrane interne mitochondriale et notamment les enzymes impliquées dans la chaîne de transfert d'électrons et le système de phosphorylation oxydative, assurant l'organisation des crêtes mitochondriales, et sont donc indispensables à de nombreux processus bioénergétiques mitochondriaux (Ren, Phoon, and Schlame 2014; Musatov and Sedláč 2017; Ikon and Ryan 2017). De plus, les CL assurent le contrôle de la qualité mitochondriale par la régulation de l'autophagie mitochondriale (mitophagie) (Chu et al. 2013). En raison de la présence de chaînes d'acyles gras insaturés, les CL sont sensibles au stress oxydatif. L'équilibre entre les chaînes d'acyle gras saturés et insaturés est critique pour la régulation de l'apoptose mitochondriale, en particulier, en réponse aux médicaments thérapeutiques.

A ce jour il existe très peu de données sur la nature et les effets biologiques des CL en clinique dans le contexte du cancer. Néanmoins, une dérégulation du métabolisme de la CL a été observée dans plusieurs types de cancer et pourrait, par conséquent, être une cible thérapeutique potentielle. Des études suggèrent une fonction de suppression de tumeur pour la CLS (Feng et al. 2018; Yin et al. 2019). Contrairement à la CLS, les études proposent une fonction tumorigénique pour la tafazzin (TAZ) (Chen, Zhang, and Zheng 2017; Pathak et al. 2014). Cependant, si cet effet tumorigène de la TAZ est toujours associé et implique des changements de la quantité et de la nature des CL n'est pas toujours déterminé. La composition en acides gras des CL ne corrèle que très peu avec la quantité en ARNm de la CLS ou de la TAZ. Il est donc, notamment, important de mieux comprendre in vitro le lien entre les CL et les mécanismes de la résistance à la DOX.

L'objectif de cette étude était d'étudier le rôle du métabolisme des CL dans la chimiorésistance associée au cancer du sein. Notre hypothèse est que l'altération du métabolisme des CL est la conséquence de l'altération de son enzyme de remodelage, la TAZ, et que ceci joue un rôle dans la résistance des cellules cancéreuses mammaire à la DOX. Dans ce but, nous avons utilisé deux lignées cellulaires cancéreuses du sein sensible (MCF-7) et résistante (MCF-7dox) à la DOX. La 1^{ère} partie du travail devait nous permettre d'identifier des

différences de métabolisme des CL entre des cellules sensibles et résistantes à la DOX. La 2^{ème} partie de cet objectif était d'étudier la présence de liens possibles de causalité entre les différences de métabolisme des CL observées et la sensibilité à la DOX. Pour cela, nous avons notamment utilisé deux lignées cancéreuses du sein d'agressivités différentes : MCF-7 et MDA-MB-231, dans lesquelles le gène codant pour la TAZ a été invalidé.

Résultats

1. Le métabolisme des CL est altéré dans les cellules cancéreuses mammaires résistantes à la DOX (MCF-7dox)

Nos études de la quantification des CL par la technique de spectrométrie de masse a mis en évidence une diminution de 30% de la quantité des CL dans les cellules MCF-7dox par rapport à la lignée sensible MCF-7 (**Figure 33A**). De plus grâce à cette technique, nos résultats montrent également que la proportion des acides gras constituant la chaîne latérale des CL est différente entre les deux lignées sensible et résistante à la DOX (**Figure 33B**). Dans les cellules sensibles, les CL sont majoritairement composées de l'acide palmitoléique (16:1). Au contraire, la quantité des CL possédant majoritairement de l'acide oléique (18:1) et l'acide linoléique (18:2) est augmenté de manière significative dans les cellules résistantes MCF-7dox par rapport aux cellules sensibles (**Figure 33C**).

Nos analyses en HPTLC ont montré que non seulement la quantité des CL est diminué dans les MCF-7dox mais aussi que la quantité de MLCL est augmentée dans ces lignées (**Figure 33D**) suggérant un problème au niveau du remodelage des CL et donc dans la maturation des CL.

L'ensemble de ces résultats montre une modification du métabolisme des CL dans les cellules cancéreuses mammaires résistantes à la DOX.

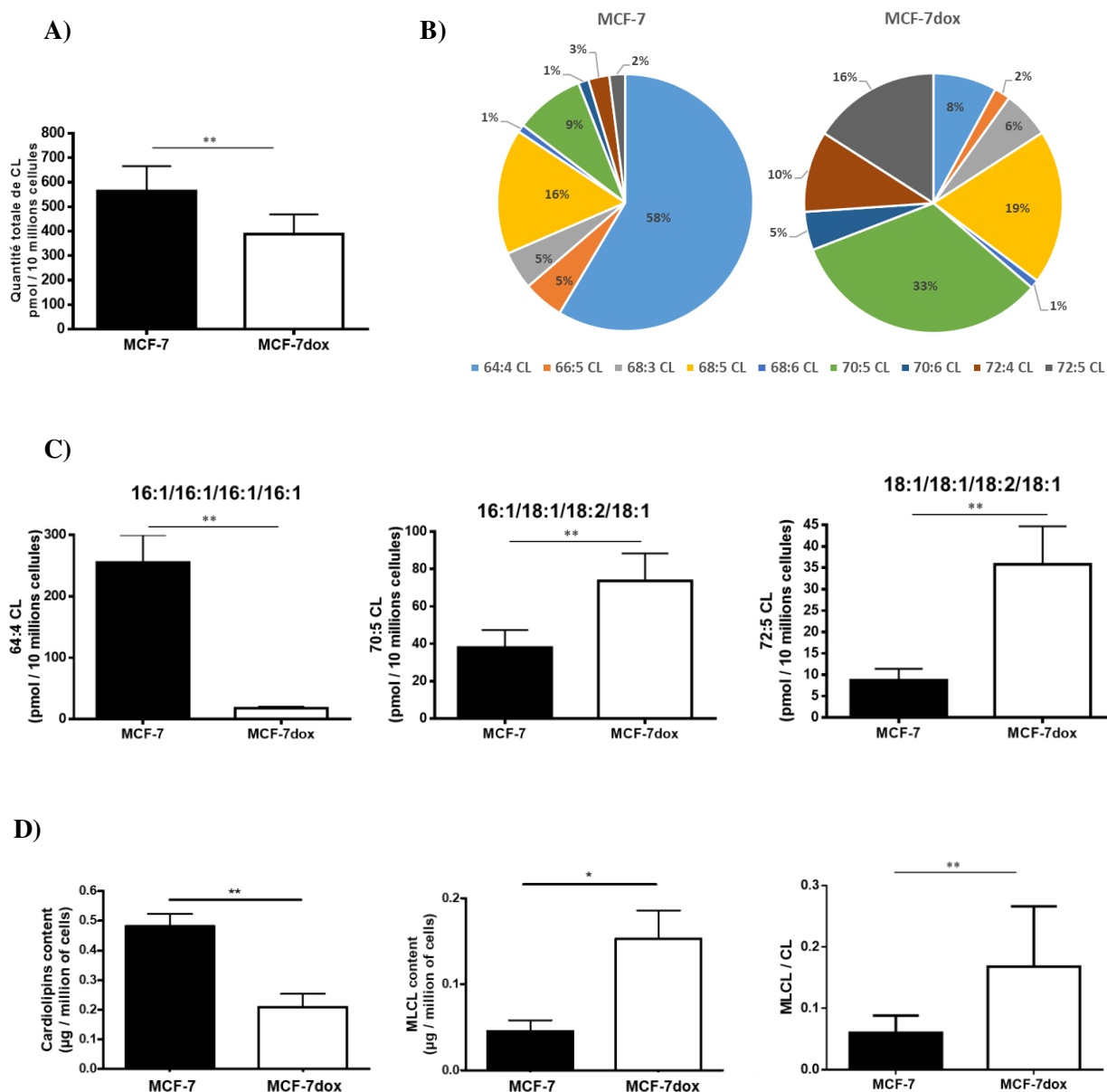


Figure 33. Etude du métabolisme des cardiolipines dans les cellules MCF-7 et MCF-7dox.

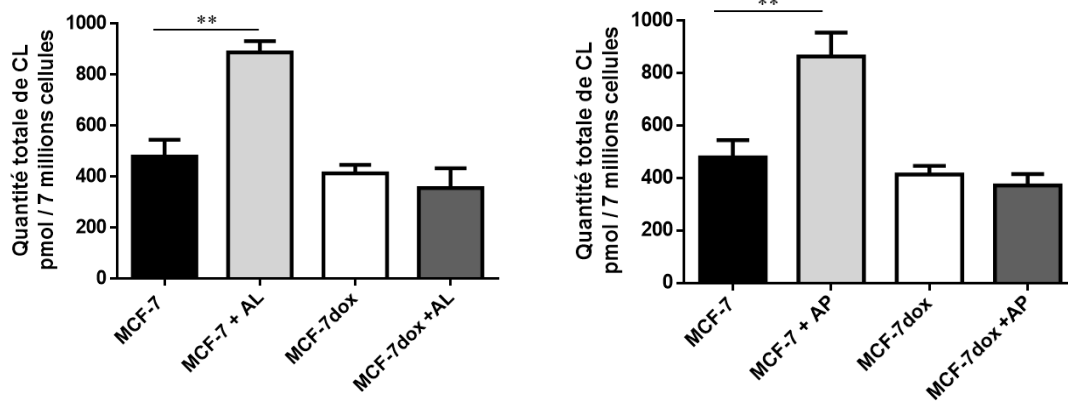
A. Quantification des CL par spectrométrie de masse. **B.** Histogrammes montrant la proportion des acides gras constituant les chaînes latérales des CL. La signification des compositions des CL représentées sur les histogrammes : 64 :4 signifie que la chaîne est composée de quatre 16 :1 ; 66 :5 (trois 16 :1 et un 18 :2), 68 :3 (16 :1, 16 :0 et deux 18 :1), 68 :5 (deux 16 :1, 18 :1, 18 :2), 68 :6 (deux 16 :1 et deux 18 :2), 70 :5 (16 :1, deux 18 :1 et un 18 :2), 70 :6 (16 :1, 18 :1, deux 18 :2), 72 :4 (quatre 18 :1), 72 :5 (trois 18 :1, un 18 :2). 16 :0 ; acide palmitique, 16 :1 ; acide palmitoléique, 18 :1 ; acide oléique, 18 :2 ; acide linoléique. **C.** Comparaison de trois compositions majeures des CL. **D.** Quantification des CL et des MLCL réalisée par la technique HPTLC. Résultats sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, N=6.

2. La reprogrammation du métabolisme des cardiolipines dans les MCF-7dox est due à l'altération de la tafazzin

Des résultats précédents obtenus au laboratoire avaient montré une diminution de la quantité protéique de la TAZ dans les cellules MCF-7dox. L'activité de TAZ, principale enzyme du remodelage des CL, permet de transférer des chaînes d'acides gras à la MLCL afin de former la CL mature et fonctionnelle (Xu et al. 2005; Claypool, McCaffery, and Koehler 2006). Ce processus modifie le profil de la CL en fonction de la disponibilité des chaînes d'acyle gras dans l'environnement et peut être manipulé par la supplémentation en lipides (Ting, Chao, and Hsu 2015).

Afin d'évaluer le fonctionnement de la TAZ, nous avons étudié sa capacité de transfert des acides gras au niveau des chaînes latérales des CL. Dans ce but, nous avons mis les cellules en présence de l'acide palmitique (16 :0) et l'acide linoléique (18 :2) pendant 72h. La quantité et la composition des CL est ensuite étudiée par spectrométrie de masse. Nous avons observé que l'enrichissement du milieu en AP et AL augmente de façon significative la quantité des CL dans les cellules MCF-7 (**Figure 34A**). Nos résultats montrent également une augmentation significative des espèces de CL riches en acide linoléique et en acide palmitoléique (16 :1) (**Figure 34B**) dans les cellules MCF-7. En revanche, dans les cellules MCF-7dox, la quantité et la composition des CL n'est pas modifiée suite au traitement avec ces mêmes acides gras (**Figure 34A et Figure 34B**). Ces résultats confirment que l'activité de la TAZ est altérée dans les MCF-7dox

A)



B)

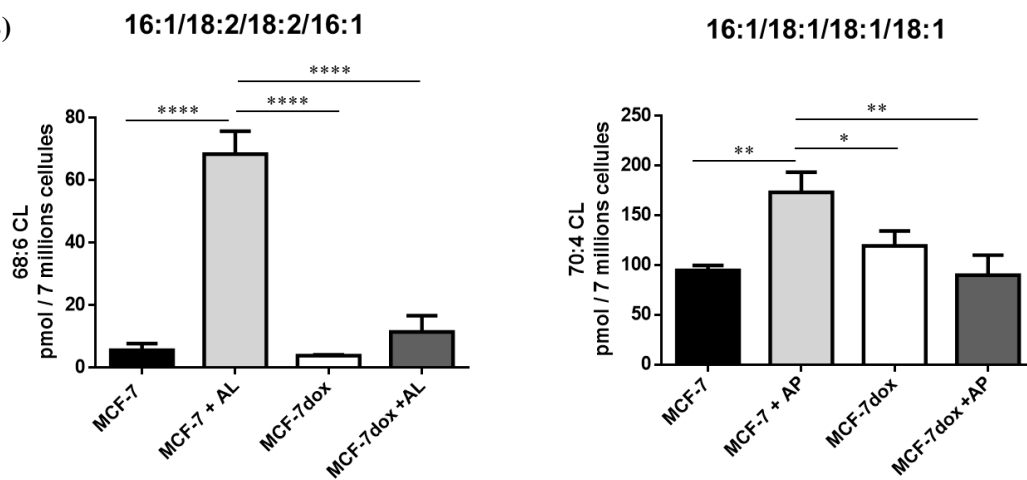


Figure 34. Effet de l'acide palmitique (AP) et de l'acide linoléique (AL) sur la quantité et la composition des CL dans les cellules MCF-7 et MCF-7dox. Etude de spectrométrie de masse de la quantité (A) et de la composition (B) des CL. Résultats sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, N=3.

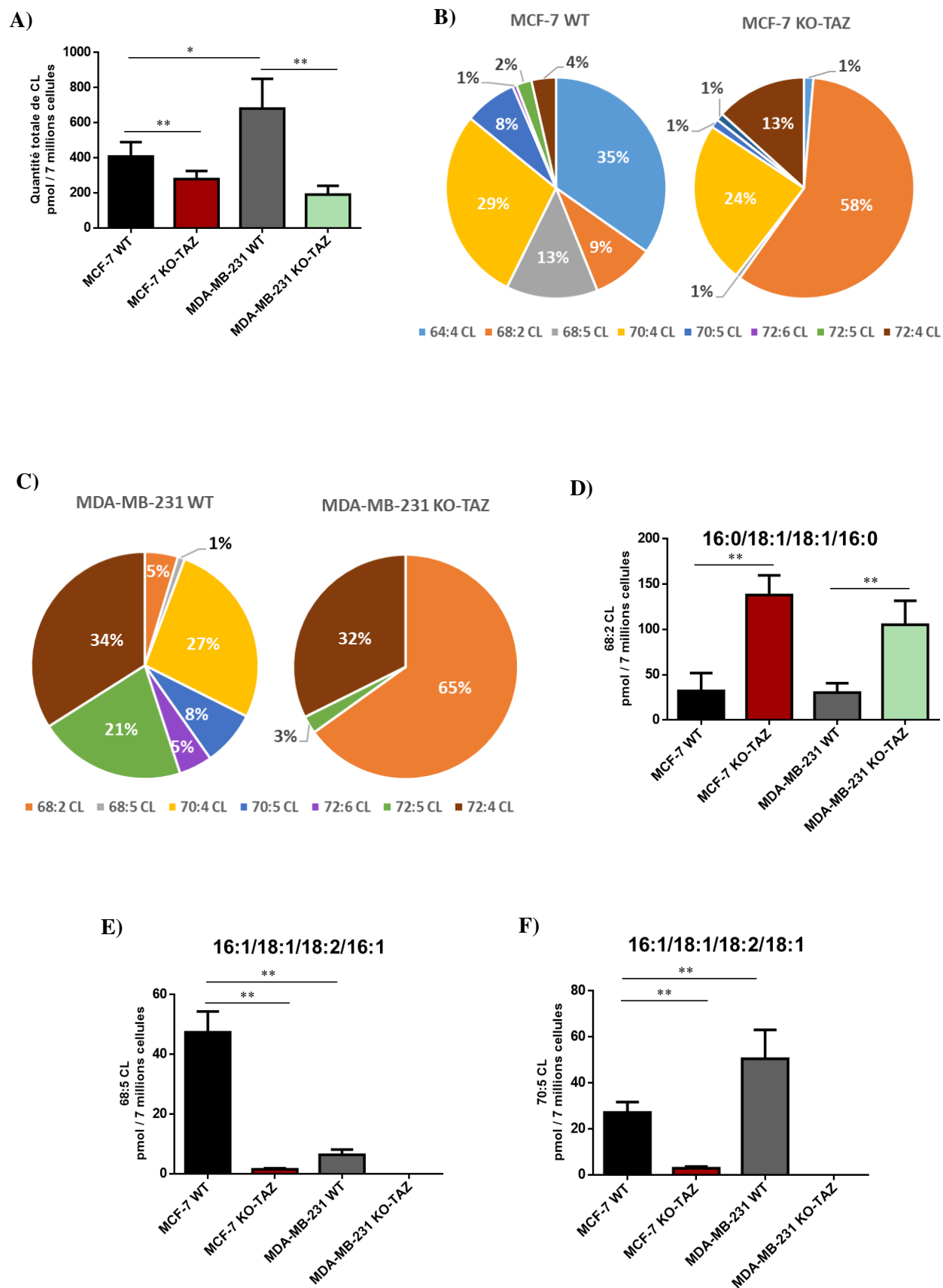
3. L'invalidation de la TAZ modifie le métabolisme des cardiolipines dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231

Afin d'étudier plus précisément le rôle du métabolisme des CL dans la résistance à la DOX, des lignées KO (technique Crispr/Cas9) pour les enzymes de biosynthèse (CLS) et de remodelage (TAZ et LCLAT1) ont été construites à partir de deux lignées cancéreuses mammaires d'agressivités différentes (MCF-7 et MDA-MB-231), permettant ainsi, la construction des lignées KO-CLS, KO-TAZ et KO-LCLAT1.

Nos analyses en spectrométrie de masse montrent une diminution de 30% et de 70% de la quantité des CL dans les cellules MCF-7 KO-TAZ et MDA-MB-231 KO-TAZ respectivement (**Figure 35A**). De même, nous avons observé une forte modification de la proportion des différentes compositions des CL dans les lignées KO-TAZ (**Figure 35B et Figure 35C**). Quelle que soit la lignée considérée, les résultats montrent notamment une augmentation remarquable de l'espèce 68 :2 dans les KO-TAZ, c'est-à-dire des CL possédant de l'acide palmitique (16 :0) et de l'acide oléique (18 :1) (**Figure 35D**). La présence des acides gras saturés dans la chaîne latérale des CL est indicative des CL immature. Nos résultats ont également montré une diminution très significative de la quantité des espèces 68 :5 et 70 :5 c'est-à-dire des CL possédant quatre acides gras insaturés (16 :1 et 18 :1 et 18 :2) dans la chaîne latérale (**Figure 35E et Figure 35F**). Les cellules MDA-MB-231 KO-TAZ sont composées principalement de CL 68 :2 possédant deux chaînes d'acide palmitique (16 :0) (**Figure 35D**). De façon intéressante, la proportion des CL possédant principalement quatre acides gras monoinsaturés dans leur chaîne latérale (70 :4 dans les MCF-7 et 72 :4 dans les MDA-MB-231) n'est pas modifiée suite à l'invalidation de la TAZ (**Figure 35B et Figure 35C**). Curieusement, nos analyses en HPTLC ont montré que l'invalidation du gène TAZ ne modifie pas la quantité absolue des MLCL dans nos cellules (**Figure 35G**). De plus, augmentation de la ratio MLCL/CL est uniquement observé dans les cellules MCF-7 (**Figure 35H**).

Malgré la diminution de la quantité protéique de la CLS et la LCLAT1 dans les cellules KO-CLS et KO-LCLAT1, le métabolisme des CL n'est pas modifié dans ces cellules (**Figure 35I et Figure 35J**).

Ces données confirment l'importance de la TAZ dans le processus de remodelage des CL et montrent que l'altération de la TAZ suffit pour altérer le métabolisme des CL.



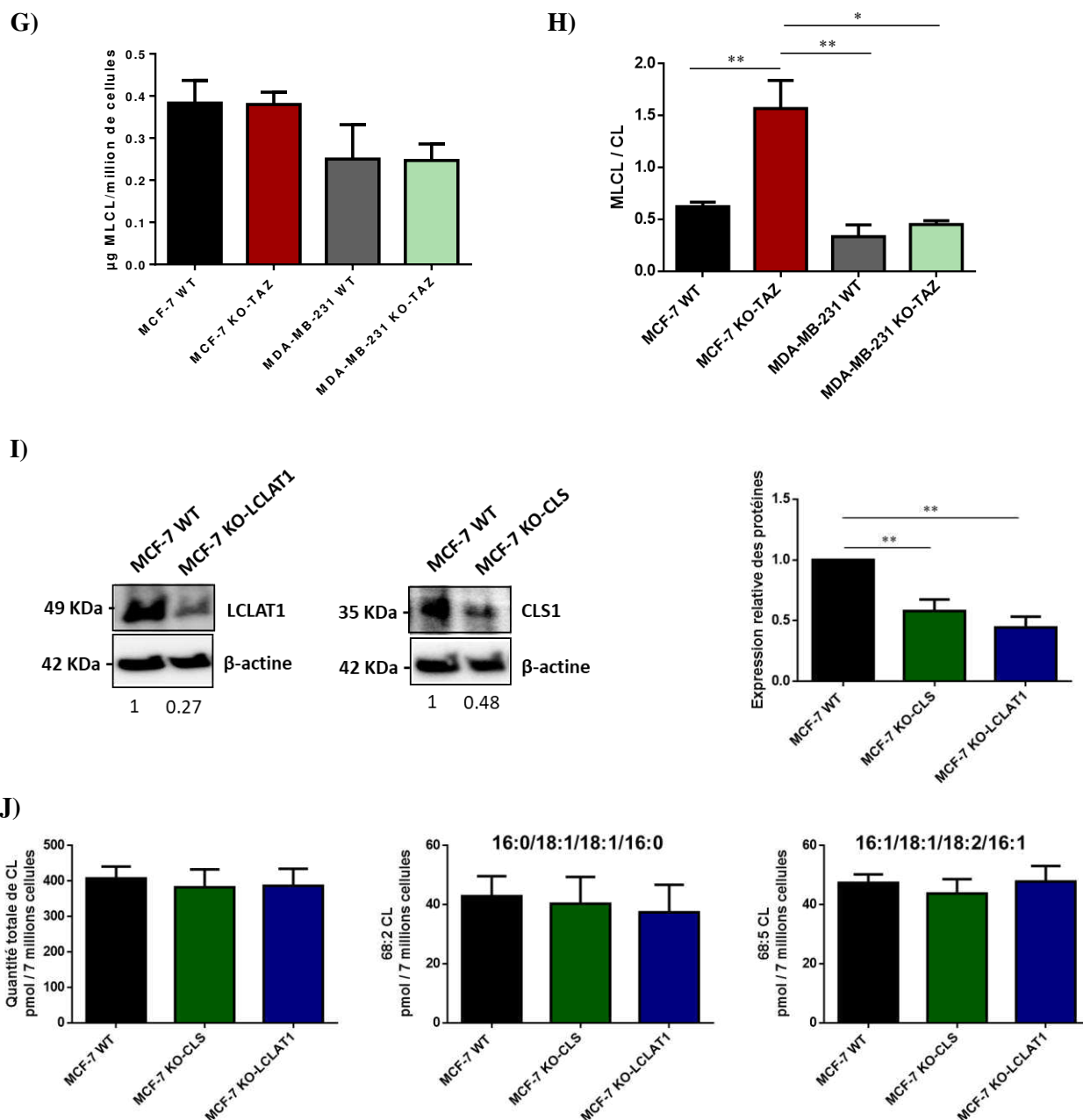


Figure 35. Effets de l'invalidation des gènes TAZ, CLS et LCLAT1 sur le métabolisme des CL. A. Comparaison de la quantité des CL. **B et C.** Histogramme montrant la proportion des acides gras constituant les chaînes latérales des CL dans les cellules MCF WT et KO-TAZ (**B**) et les cellules MDA-MB-231 WT et KO-TAZ (**C**). La signification des compositions des CL représentées sur les histogrammes : 64 :4, signifie que la chaîne est composée de quatre 16 :1, 68 :2 (deux 16 :0 et deux 18 :1), 68 :5 (deux 16 :1, 18 :1, 18 :2), 70 :4 (16 :1 et trois 18 :1), 70 :5 (16 :1, deux 18 :1 et un 18 :2). 16 :0 ; acide palmitique, 16 :1 ; acide palmitoléique, 18 :1 ; acide oléique, 18 :2 ; acide linoléique. **D-F.** Comparaison des compositions des CL dans les MCF-7 WT et KO-TAZ et MDA-MB-231 WT et KO-TAZ. **G et H.** Etude de la quantité des MLCL. **I.** Image représentative d'un Western Blot et Quantification des expressions relatives des protéines CLS et LCLAT1. L'expression des protéines est normalisée par rapport à la β -actine. **J.** Etude de la quantité et de la composition des CL dans les cellules KO-CLS et KO-LCLAT1. Résultats sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, ** $p \leq 0,01$, $N=6$.

4. La modification du métabolisme des CL diminue la chimiosensibilité des cellules cancéreuses mammaire MCF-7 à la DOX

Nous avons étudié les effets du KO-TAZ sur la viabilité des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 en présence de DOX pendant 72h. Nos résultats montrent que la viabilité des MCF-7 en réponse à la DOX est augmentée dans la condition KO-TAZ en comparaison de la condition témoin (**Figure 36A**). A l'inverse, aucun effet n'a été observé sur la viabilité des cellules MDA-MB-231 KO-TAZ en comparaison des cellules WT (**Figure 36B**). Le BH3 mimétique S63 est une molécule qui cible la protéine anti-apoptotique MCL-1, permettant ainsi, l'activation de l'apoptose. Nos données montrent que les MCF-7dox sont résistantes au S63 en comparaison des MCF-7 (**Figure 36C**). Nos résultats montrent que l'inactivation de la TAZ ne modifie pas la viabilité des cellules en réponse au S63 (**Figure 36C**).

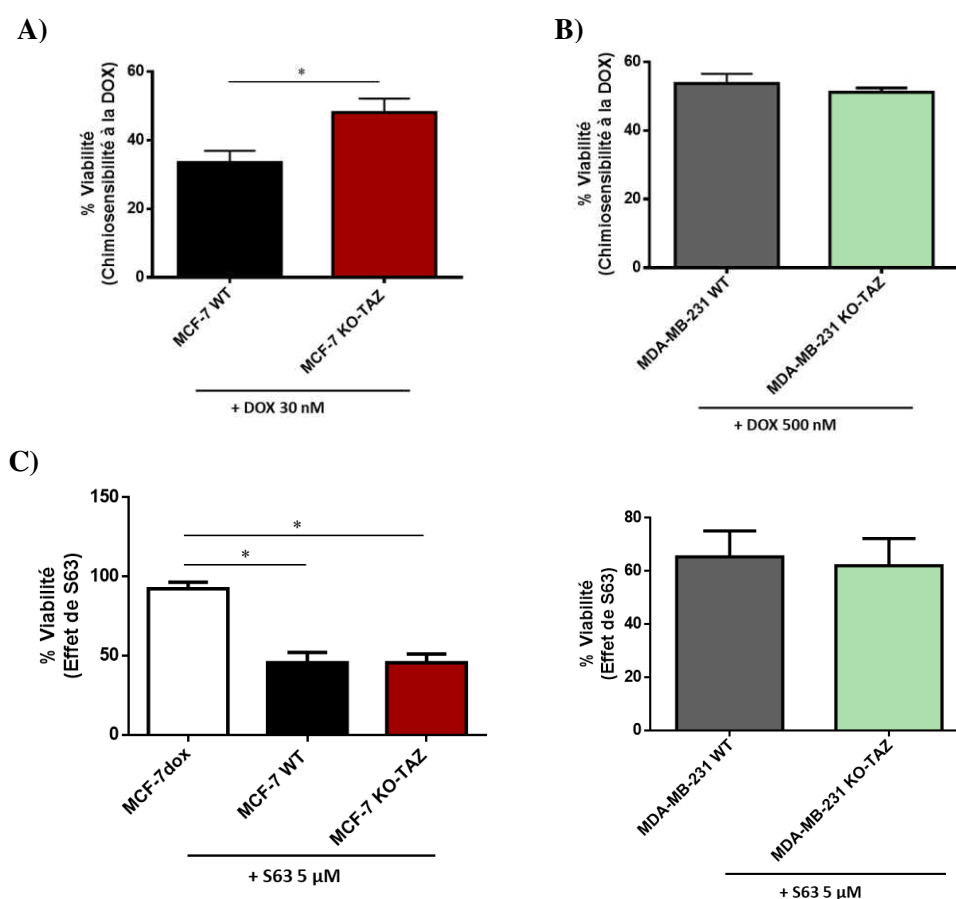


Figure 36. Effet de la modification du métabolisme des CL sur la viabilité des cellules. Etude de la viabilité cellulaire dans les MCF-7 WT et KO-TAZ (A) et MDA-MB-231 WT et KO-TAZ (B). La viabilité des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 est mesurée suite aux traitements des cellules avec de la doxorubicine (DOX) pendant 72h. C. Etude de la viabilité cellulaire en réponse au S63 pendant 24h. Résultats sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, * $p \leq 0,05$. Les résultats sont normalisés par rapport à la condition témoin non-traité (% de viabilité) (N=5).

5. La modification du métabolisme des CL ne change pas le métabolisme énergétique global ni mitochondrial dans les lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231

La CL interagit avec les complexes protéiques de la OXPHOS et permet leur intégrité structurelle et leur bonne activité enzymatique, assurant ainsi, l'organisation des crêtes mitochondriales. Elle est donc indispensable pour de nombreux processus bioénergétiques mitochondriaux. De ce fait, l'effet de la modification de la quantité et la composition des CL a été étudié sur la bioénergétique mitochondriale (consommation d'O₂, et production d'ATP) et sur le métabolisme énergétique global (en mesurant aussi la glycolyse anaérobie) dans les deux lignées MCF-7 et MDA-MB-231 témoin et KO-TAZ. L'étude de la consommation d'oxygène mitochondriale réalisée à différents états respiratoires (état basal, activité maximale de la chaîne respiratoire, gaspillage énergétique et consommation d'oxygène liée à la production d'ATP) montre qu'il n'y a pas de modification majeure de la consommation d'oxygène mitochondriale dans les KO-TAZ par rapport aux lignées WT (**Figure 37A**). Les analyses du métabolisme glycolytique anaérobie (glycolyse, capacité glycolytique et réserve glycolytique) montrent que les changements du métabolisme des CL ne modifie pas la glycolyse anaérobie des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 (**Figure 37B**). Finalement, l'étude de la production d'ATP cellulaire totale ne montre pas non plus d'effet de l'invalidation de la TAZ, quelle que soit la lignée utilisée (**Figure 37C**). L'ensemble de ces données montrent que la diminution de la quantité des CL et la modification de leur composition en acides gras liée à l'invalidation de la TAZ ne modifie pas les métabolismes énergétiques total et mitochondrial.

Les complexes protéiques de la chaîne respiratoire sont organisés en structures organisées appelées super-complexes afin d'améliorer l'efficacité du transfert d'électrons. La présence de sites de liaison spécifiques des CL a été détectée dans les complexes I, III et IV et l'association de ces complexes individuels en supercomplexes nécessite l'interaction avec les CL. Quel que soit le complexe protéique étudié, nos résultats montrent que l'assemblage des complexes et la quantité et la nature des supercomplexes de la chaîne respiratoire ne sont pas modifiées dans les lignées KO-TAZ (**Figure 37D et Figure 37E**).

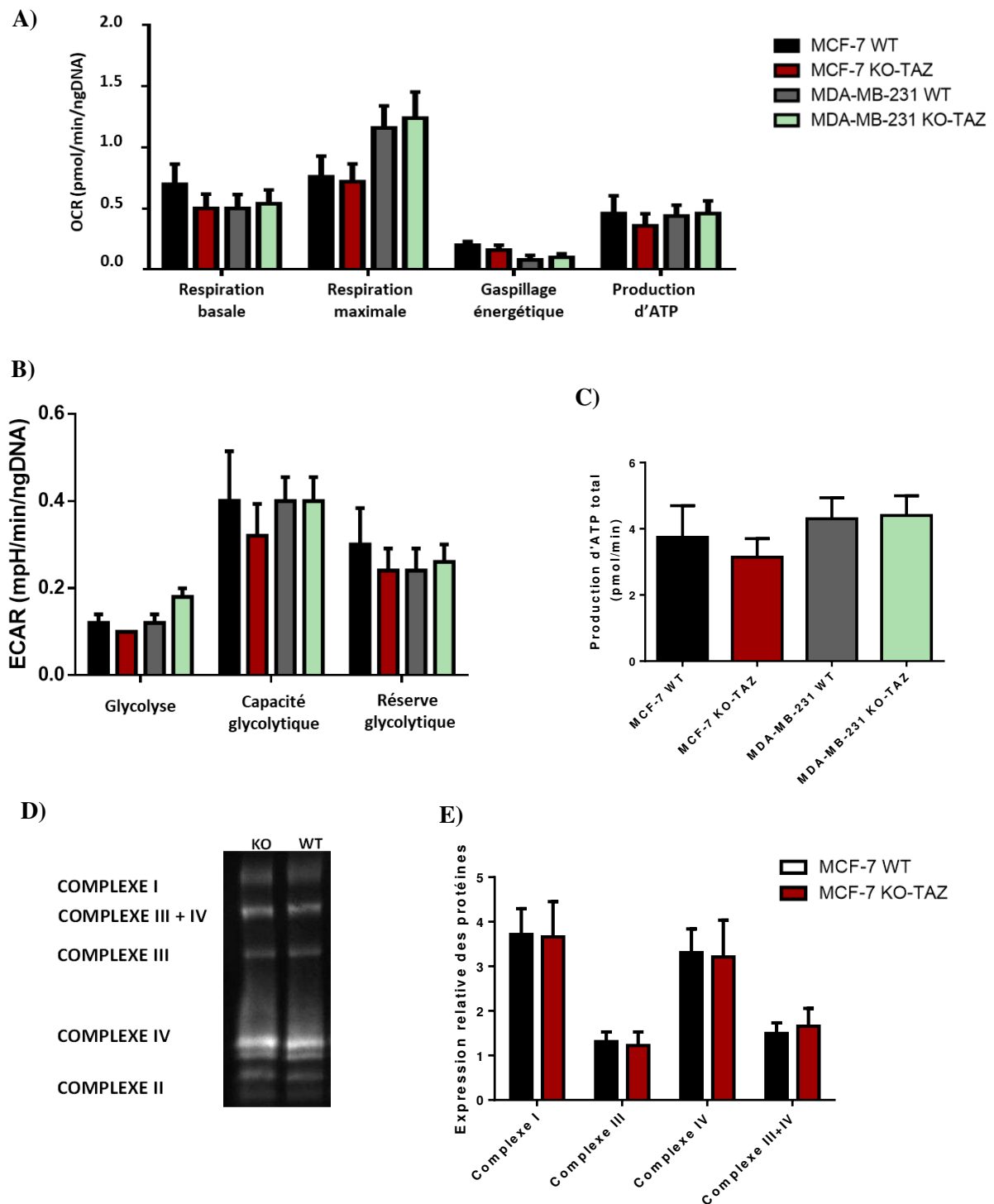


Figure 37. Effet de la modification du métabolisme des CL sur le métabolisme énergétique mitochondrial, l'assemblage des complexes et la quantité des supercomplexes de la chaîne respiratoire. A. Consommation d'oxygène mitochondriale. **B.** Glycolyse anaérobie et **C.** Etude de la production totale d'ATP dans les cellules MCF WT et KO-TAZ et les cellules MDA-MB-231 WT et KO-TAZ. **D.** Image représentative d'un BN-PAGE (Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis) **E.** Quantification des expressions relatives des protéines des complexes et des supercomplexes de la chaîne respiratoire. L'expression des protéines est normalisée par rapport au complexe II (succinate déshydrogénase). Résultats sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, N=6.

6. La modification du métabolisme des cardiolipin es semble affecter positivement l'activation de la mitophagie dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7

Comme mentionné précédemment, une des voies impliquées dans l'activation de la mitophagie est la voie médiée par les CL. L'activité mitophagique des cellules a été étudiée par l'analyse de la colocalisation des mitochondries et des lysosomes. Nos résultats ne montrent aucun effet du FCCP (inducteur de la mitophagie par dépolarisation) ou de la DOX sur la colocalisation mitochondries-lysosome dans les MCF-7 (**Figure 38A et Figure 38B**). De base, nous n'observons aucune différence entre les MCF-7 et les MCF-7 KO-TAZ. Nos résultats indiquent que le FCCP stimule la colocalisation mitochondrie-lysosome dans les MCF-7 KO-TAZ. Par contre, nous n'observons aucun effet de la DOX dans ces cellules (**Figure 38A et Figure 38B**).

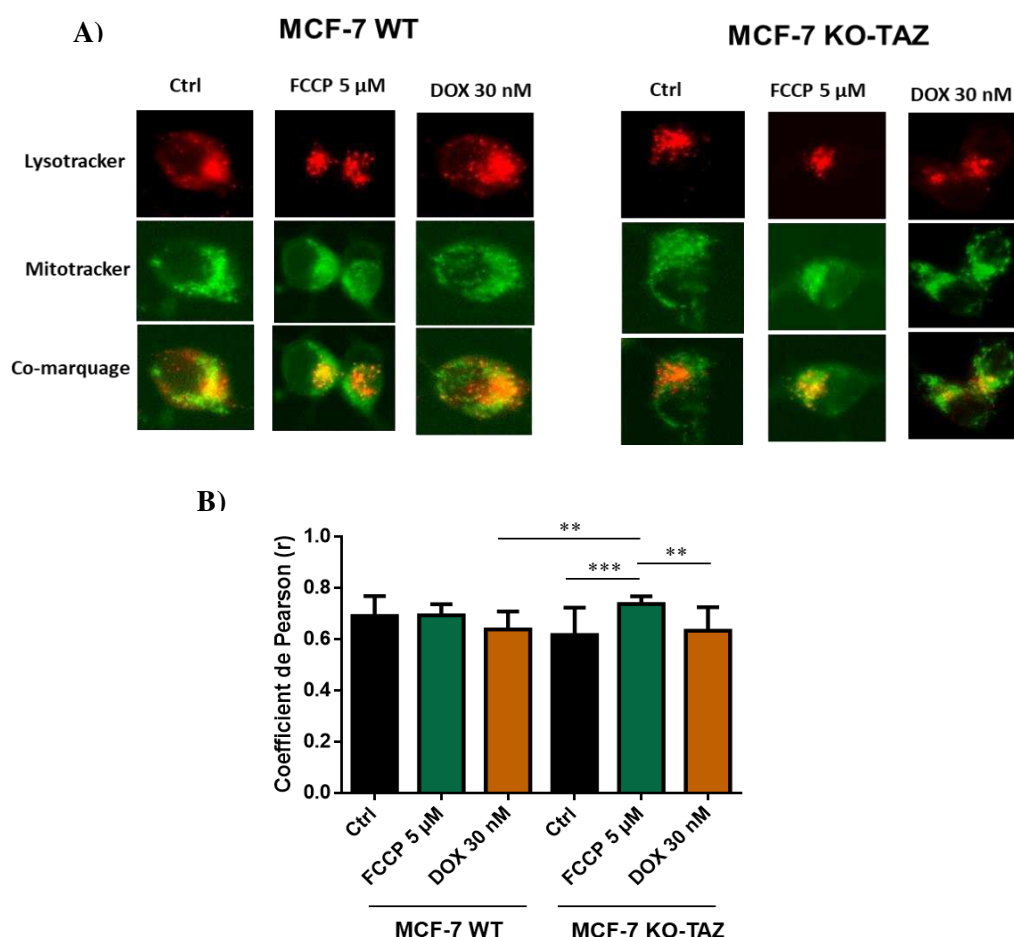


Figure 38. Etude de l'activation de la mitophagie dans les cellules MCF-7 KO-TAZ. **A.** Schéma représentatif de la colocalisation des mitochondries/lysosomes observée en microscopie à fluorescence avec un grossissement 400x. **B.** Quantification de la colocalisation des mitochondries/lysosomes effectuée en déterminant le coefficient de corrélation de Pearson (r). L'analyse a été réalisée sur trois expériences indépendantes (N=3) sur 10 cellules différentes à chaque fois. Résultats sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, ** $p \leq 0,01$; $n=30$.

7. La modification du métabolisme des CL ne modifie pas la migration des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231

Plusieurs études proposent une fonction de tumorigénèse pour la TAZ. Il a été démontré que le niveau d'expression de la TAZ était augmenté dans certains types de cancer. Cependant, si cet effet tumorigène de la TAZ est toujours associée et implique des changements de la quantité et de la nature des CL n'est toujours pas connu. Nous avons aussi étudié les effets de l'inactivation de la TAZ sur la migration des cellules MDA-MB-231. Les cellules MCF-7 ayant une capacité de migration très réduite ont été exclues de cette analyse. L'étude de la migration réalisée en insert montre que l'inactivation du gène de la TAZ ne modifie pas la capacité migratoire des cellules MDA-MB-231 (**Figure 39**).

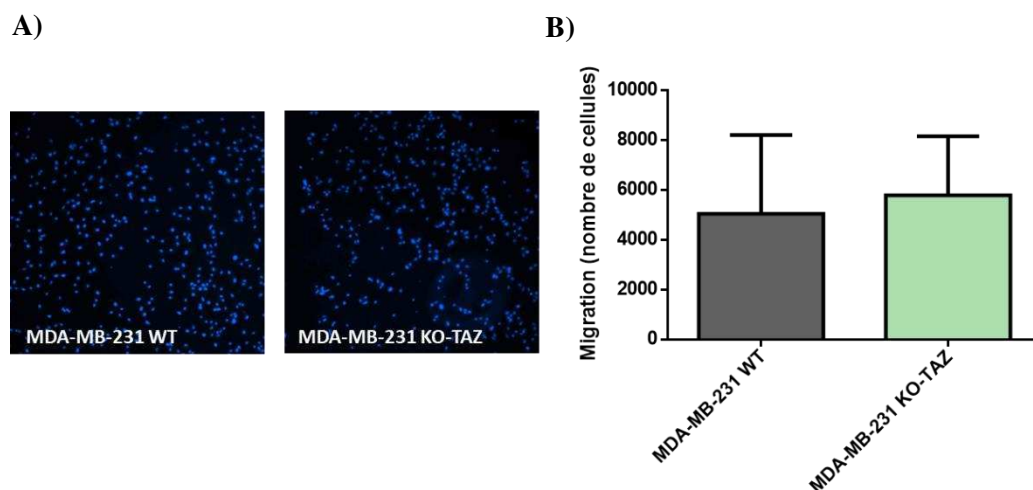


Figure 39. Étude de la migration cellulaire dans les cellules MDA-MB-231 KO-TAZ. A. Image représentative de la migration en insert des cellules, 24 heures après l'ensemencement. B. Résultats sous forme de moyenne $\pm$ écart-type. L'analyse de la migration cellulaire a été réalisée sur trois expériences indépendantes (N=3) comprenant 5 images par expérience (n=15).

Discussion

La CL est un dimère lipidique constitué de deux groupes phosphatidyl liés par un glycérol. Ainsi, la CL a quatre chaînes acyle attachées, la distinguant des phospholipides typiques qui ont deux chaînes acyle. La composition finale de la chaîne acyle de la CL n'est pas définie au cours de sa biosynthèse, mais au cours des étapes de remodelage via des réactions de désacylation-réacylation / transacylation (Schlame et al. 2012). Ces mécanismes de remodelage génèrent une forme moléculaire finale de CL qui est homogène par rapport à sa composition en chaîne acyle, présente une symétrie entre les deux centres chiraux de la CL et est spécifique du type cellulaire et du tissu (Xu et al. 2019; Vaz et al. 2003). Autrement dit, la forme moléculaire finale de la CL n'est pas la même dans différents organismes ou même dans différents tissus au sein du même organisme, ce qui suggère que les différentes formes moléculaires de CL observées dans différentes cellules et tissus sont adaptées pour répondre aux exigences fonctionnelles et / ou demandes énergétiques de cette cellule / tissu (Gu et al. 2004; Xu et al. 2006).

Dans cette étude, nous avons démontré que dans les cellules cancéreuses du sein résistantes à la DOX (MCF-7dox) la quantité des CL et la composition en acide gras des chaînes latérales des CL sont différentes par rapport aux cellules sensibles. Ces changements observés dans les cellules MCF-7dox sont accompagnés d'une augmentation de la quantité de monolysocardiolipine (MLCL), suggérant ainsi, une anomalie au niveau du processus de remodelage des CL. Ceci est confirmé par nos résultats qui montrent que le traitement avec de l'AP et de l'AL modifie la quantité et la composition des CL dans les cellules MCF-7 mais pas dans les cellules MCF-7dox. Le remodelage de la CL est initié par l'élimination d'une seule chaîne acyle entraînant la formation de MLCL. Au moins trois enzymes distinctes ont la capacité d'attacher une chaîne acyle à la monolysocardiolipine: la tafazzin (TAZ), la monolysocardiolipine acyltransférase 1 (MLCLAT1) et l'acyl-CoA: lysocardiolipine acyltransférase-1 (LCLAT1 ou ALCAT1). Parmi ces trois enzymes, la TAZ est la plus étudiée et il n'y a presque pas d'étude concernant le rôle joué par la MLCLAT1 et l'ALCAT1. A la différence des 2 autres qui utilisent l'acyl-coA, la TAZ est une transacylase (Hijikata et al. 2015) qui utilise des phospholipides comme donneurs de chaîne acyle. Surtout, la TAZ est capable de remodeler les quatre chaînes acyle via une réaction de transacylation bidirectionnelle (Claypool et al. 2008).

Notre objectif global était d'étudier le rôle des CL et les mécanismes associés dans la chimiorésistance du cancer du sein. Malgré de nombreuses tentatives avec des techniques

différentes, nous n'avons jamais réussi à augmenter la quantité de CL dans les MCF-7dox. Nous avons donc décidé de modifier le métabolisme des CL dans les cellules sensibles. Dans ce but les trois principales enzymes du métabolisme des CL : la CLS, l'ALCAT1 et la TAZ ont été invalidées. Etant donné que la CL a une demi-vie relativement longue, l'inhibition transitoire des différents enzymes de métabolisme des CL n'a pas été efficace pour une diminution significative de la quantité des CL. De ce fait, les lignées KO pour les trois enzymes ont été construites grâce à la technique Crispr/Cas9. Nos résultats montrent que seule l'invalidation de la TAZ entraîne une modification du métabolisme des CL. Ces résultats soulignent l'importance de la TAZ dans le métabolisme des CL.

Bien que la TAZ et l'ALCAT1 catalysent, toutes les deux, le remodelage des CL, nous n'avons pas observé le même effet sur le métabolisme des CL dans les cellules KO correspondantes. Cette différence pourrait être liée au fait que la TAZ peut catalyser le remodelage de la CL en une seule étape, au cours de laquelle les groupes acyle sont échangés entre un phospholipide et un lysophospholipide. Dans ce processus, les phospholipases ne sont pas nécessaires pour générer une MLCL puisque la réaction de transacylation entre un lysophospholipide et une CL peut générer directement un phospholipide et une MLCL. La transacylation subséquente entre le MLCL et un phospholipide adjacent génère une CL remodelée et un mono-lysophospholipide (Ye, Shen, and Greenberg 2016). Néanmoins, bien que l'invalidation de la TAZ soit associée avec une diminution de la quantité et de la composition des CL, nous n'avons pas observé d'augmentation significative de la quantité absolue des MLCL. Ceci, est peut-être dû au fait que l'invalidation de la TAZ seule, n'est pas suffisante pour complètement modifier le métabolisme des CL et que d'autres enzymes du remodelage (ALCAT1 et MLCLAT1) peuvent fonctionner et compenser cette diminution d'activité de la TAZ. De ce fait, une invalidation de TAZ en parallèle avec l'ALCAT1 ou la MLCLAT1 pourrait apporter des informations complémentaires.

Le remodelage de la CL médié par la TAZ déplace la composition en acides gras vers des acides gras insaturés. Nous avons observé que l'invalidation de la TAZ augmente les espèces de CL riches en acides gras saturés type 16 :0 et diminue celles riches en acides gras insaturés type 18 :2. Ceci confirme l'importance du bon fonctionnement de la TAZ afin d'avoir des CL matures.

L'obtention des lignées KO-TAZ nous a permis d'étudier le lien de causalité entre la quantité/composition des CL et la chimiorésistance associée au cancer du sein. Nos résultats ont montré une diminution de la sensibilité des cellules MCF-7 KO-TAZ par rapport aux cellules WT, suggérant ainsi, une implication des CL dans la résistance à la DOX. Néanmoins,

nous n'observons aucun effet de l'invalidation de la TAZ sur la sensibilité des MDA-MB-23. Cette observation peut être due au fait que la sensibilité des MDA-MB-231 à la DOX est de base inférieure à celle des MCF-7 (IC50 10 fois supérieur par rapport aux MCF-7). Les MCF-7 sont décrites comme des cellules avec une capacité métastatique quasi nulle alors que les cellules MDA-MB-231 ont une capacité d'invasion et de migration très élevée. De façon intéressante, nos résultats montrent que la quantité de CL dans les MDA-MB-231 WT est supérieure à celle des MCF-7 WT. De plus, nos résultats montrent que dans les MDA-MB-231 WT les CL sont majoritairement composés de chaînes d'acide gras plus longues (18 carbones) alors que la quantité de CL avec des chaînes acides gras plus courtes (16 carbones) est plus faible que dans les MCF-7 WT. Par ailleurs, bien que l'invalidation de la TAZ diminue significativement la quantité des CL dans les deux lignées KO, les changements de composition des CL sont un peu différents entre les deux lignées. Notamment, l'invalidation de la TAZ entraîne la disparition totale de l'espèce 70:4 dans les MDA-MB-231 KO-TAZ sans modification de cette espèce dans les MCF-7 KO-TAZ. Il pourrait être intéressant d'approfondir le rôle de cette espèce de CL. Par ailleurs, cela pose la question de savoir ce qui est le plus important entre les changements de quantité ou de composition des CL dans le lien avec la chimiorésistance à la DOX.

Nous avons également étudié les effets de la modification de la quantité/composition des CL en réponse à une molécule BH3-mimétique, le S63. La survie des cellules tumorales dépend fortement de l'expression de certaines protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Une approche thérapeutique intéressante consiste à inhiber ces protéines en utilisant des agents qui imitent les domaines d'homologie 3 Bcl-2 (BH3) des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, permettant ainsi la neutralisation de ces protéines (Zhang, Ming, and Yu 2007:3). Le S63 est l'inhibiteur de la protéine anti-apoptotique MCL-1. Des études suggèrent que les CL pourraient jouer un rôle important dans la régulation du réseau d'interactions entre les différents acteurs de la famille Bcl-2 et donc dans la réponse apoptotique associée. Nos résultats montrent que la modification de la quantité/composition des CL suite à l'invalidation de TAZ ne modifie pas la mort cellulaire liée à S63. Néanmoins, ces résultats sont préliminaires et il serait nécessaire d'utiliser d'autres outils/techniques et d'autres BH3 mimétiques pour approfondir la question.

Le métabolisme des CL, en particulier, la TAZ est devenu un point de recherche d'intérêt depuis la découverte d'une maladie génétique, le Syndrome de Barth. Le Syndrome de Barth a une pathogenèse unique : c'est la seule maladie humaine connue où le défaut principal est le remodelage de la CL (Vreken et al. 2000). Il est caractérisé par une mutation dans le gène de la TAZ (Bione et al. 1996) et ainsi, une diminution de la quantité des CL et une augmentation

du rapport MLCL/CL. La CL joue un rôle important dans le maintien de la structure mitochondriale. En particulier, la CL stabilise les supercomplexes de la chaîne respiratoire et optimise la production d'énergie dans les mitochondries (Kiebish et al. 2008). Ce rôle de la CL dans le maintien de l'intégrité mitochondriale est renforcé par divers degrés d'anomalies structurelles et fonctionnelles des mitochondries isolées de patients atteints de Syndrome de Barth (Acehan et al. 2007; Acehan et al. 2009). Nos précédents résultats ont montré que dans les lignées cellulaires résistantes à la DOX, les activités du complexe I et du complexe IV de la chaîne respiratoire sont diminuées du fait d'une altération d'assemblage de différentes sous-unités constituant ces complexes. Une altération d'assemblage pour les supercomplexes est également observée. La diminution de l'activité et de l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire étant associée avec une diminution de la consommation d'oxygène et une augmentation de la glycolyse anaérobie. Nous avons étudié l'effet de la modification de la quantité et la composition des CL sur la bioénergétique mitochondriale (consommation d'oxygène et production d'ATP) et sur le métabolisme énergétique globale (en mesurant la glycolyse anaérobie) dans les deux lignées MCF-7 et MDA-MB-231 témoin et KO-TAZ. Nos résultats ont montré que la diminution de la quantité des CL et la modification de leur composition en acides gras liée à l'invalidation de la TAZ n'a aucun effet ni sur l'assemblage des complexes et des supercomplexes de la chaîne respiratoire, ni sur les métabolismes énergétiques global et mitochondrial. Il semble que l'assemblage des complexes OXPHOS induit un remodelage des CL, qui, à son tour, conduit à une stabilisation des CL. Ainsi, il a été montré que le knockdown (KD) des complexes OXPHOS affectait la composition des CL chez la drosophile. De plus, le KD de l'expression d'OXPHOS avait le même effet sur les CL que le KD de la TAZ, y compris un changement dans la composition des CL et l'accumulation de MLCL (Xu et al. 2019). De ce fait, il n'est pas exclu que le plus important dans les associations entre le métabolisme des CL et le fonctionnement des complexes OXPHOS qui ont été décrites ne soit pas les CL mais plutôt les complexes OXPHOS. Ainsi, les changements de métabolisme des CL observés dans des conditions où il y a un dysfonctionnement des complexes OXPHOS seraient secondaires au dysfonctionnement des complexes OXPHOS et non à l'origine de ces dysfonctionnements.

Une des voies par lesquelles les cellules peuvent éviter l'apoptose consiste à éliminer les mitochondries endommagées par mitophagie. Les études ont montré que l'externalisation de CL à la surface mitochondriale agit comme un signal d'élimination des mitochondries dans les cellules (Chu et al. 2013). De plus, certaines études suggèrent que l'inhibition globale de la mitophagie sensibilise les cellules aux traitements anticancéreux (Yao et al. 2019; Lee et al. 2018). Par ailleurs, il semble que la chimiorésistance observée dans les cellules MCF-7dox

implique l'activation de la mitophagie en réponse à la DOX. Selon nos résultats, il semble que l'invalidation de la TAZ modifie l'activation de la mitophagie induite par une dépolarisation de la membrane interne mitochondriale (condition FCCP). A l'inverse, nous n'avons observé aucun changement de la colocalisation mitochondries/lysosomes en réponse à la DOX dans les MCF-7 KO-TAZ. Ces résultats sont préliminaires et il serait notamment nécessaire de vérifier l'activité d'élimination des mitochondries en regardant l'activité protéolytique des lysosomes.

Il est généralement observé qu'une déficience de la TAZ s'accompagne d'une modification de la quantité de MLCL et du rapport MLCL/CL. Il semble évident que les MLCL et les CL ont des propriétés physiques différentes et auraient donc des effets biologiques différents (Boyd, Alder, and May 2018; Duncan 2020). Il serait donc intéressant d'étudier le rôle des MLCL, indépendamment de celui des CL, afin de mieux comprendre nos résultats obtenus avec les KO-TAZ.

En conclusion, cette étude montre l'importance de la TAZ dans le métabolisme des CL dans des cellules cancéreuses du sein. Cette étude suggère aussi un rôle de la TAZ dans la résistance à la DOX. En revanche, l'invalidation de la TAZ n'a pas modifié le fonctionnement bioénergétique mitochondriale et notamment l'assemblage des complexes et les super complexes de la chaîne respiratoire, questionnant le dogme actuel sur la nature de la relation CL-OXPHOS. Finalement, il serait intéressant d'étudier le rôle de variations de la quantité des CL indépendamment de variations de la composition des CL et inversement afin de mieux élucider l'implication du métabolisme des CL dans les mécanismes de la chimiorésistance associé au cancer du sein. Le rôle spécifique des MLCL mériterait aussi une attention particulière.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

La déplétion des espèces de CL riches en acide linoléique pourrait jouer un rôle important dans le développement du cancer du sein

Introduction

La CL est un phospholipide dimère unique spécifique des mitochondries et un composant essentiel des membranes mitochondriales (Schlame and Greenberg 2017). La CL se compose d'une tête glycérol, de deux groupements phosphatidiques acides et de quatre chaînes d'acides gras. Les quatre chaînes d'acides gras peuvent différer en longueur et en degré d'insaturation. La composition en acides gras de la CL est essentielle à la bioénergétique mitochondriale, puisque cela affecte les propriétés biophysiques de la membrane, lie et stabilise les complexes protéiques de la chaîne respiratoire et forme la courbure des crêtes mitochondriales. La CL est sensible à la peroxydation en raison de sa teneur élevée en chaînes d'acides gras polyinsaturés à proximité des sites de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO). La peroxydation de la CL conduit à un changement de conformation à la fois dans la tête glycérol mais aussi dans les chaînes d'acides gras, induisant une inclinaison de la molécule et une perte de symétrie et un changement d'épaisseur de la bicouche lipidique (Vähäheikkilä et al. 2018). Une teneur plus élevée en CL oxydée est associée à une fonction altérée de la chaîne respiratoire (Petrosillo et al. 2009). L'acide linoléique contenu dans la CL est un substrat de la peroxydation médiée par le cytochrome c (Tyurina et al. 2014). La peroxydation des acides linoléiques dans la CL libérerait du cytochrome c dans le cytoplasme où il joue un rôle clé dans le déclenchement de l'apoptose (Kagan et al. 2005; Kagan et al. 2006; Kagan et al. 2014).

L'objectif de ce travail était de comparer les profils des CL avec un accent mis sur la composition en acide linoléique, entre des cellules mammaires non cancéreuses et des cellules cancéreuses mammaires plus ou moins agressives. Pour cela, nous avons utilisé des cellules mammaires non-cancéreuses (MCF-10) ainsi que dans des cellules cancéreuses du sein avec un très faible pouvoir de migration/d'invasion sensibles à la DOX (MCF-7) ou chimiorésistantes (MCF-7dox) et des cellules MDA-MB-231 qui ont une capacité de migration et d'invasion très élevée.

Résultats

1. La quantité de CL est modifiée dans les cellules cancéreuses résistantes MCF-7dox et les cellules métastatiques MDA-MB-231

Nos résultats montrent une diminution significative de la quantité de CL dans les cellules MCF-7dox par rapport aux cellules MCF-10A et MCF-7 et pas de différence significative entre les cellules MCF-10A et les cellules MCF-7 (**Figure 40**). Nous avons également observé que la quantité de CL est plus élevée dans les cellules MDA-MB-231 en comparaison des cellules MCF-7 et MCF-7dox (**Figure 40**). Aucune différence n'a été observé entre les cellules MDA-MB-231 et les cellules MCF-10A. L'ensemble de ces résultats suggère que la quantité de CL serait inférieure dans des cellules chimiorésistances en comparaison de leurs cellules « mères » sensibles. A l'inverse, la quantité de CL serait inférieure dans les cellules cancéreuses avec un faible pouvoir d'invasion/migration en comparaison de cellules cancéreuses avec un fort pouvoir d'invasion. Néanmoins, il ne semble pas possible de différencier toutes les cellules cancéreuses mammaires de cellules non cancéreuses en déterminant la quantité de CL.

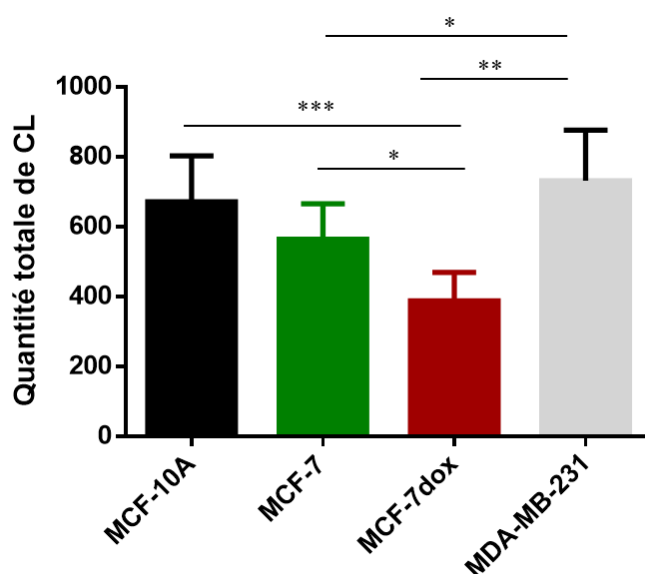


Figure 40. Etude de la quantité des cardiolipines. Quantification des CL dans les cellules MCF-10A, MCF-7, MCF-7dox et MDA-MB-231. Etude de la quantification réalisée par spectrométrie de masse. Résultats sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, N=6.

2. La composition en acides gras des CL est différente entre les cellules non-cancéreuses et les cellules cancéreuses du sein

Nous avons étudié la composition des CL dans ces quatre lignées cellulaires. Nos résultats montrent une modification remarquable de la composition en acide gras des chaînes latérales des cellules cancéreuses du sein MCF-7, MCF-7dox et MDA-MB-231 par rapport aux cellules non-cancéreuses MCF-10A. La signification des principales espèces de CL mesurée est indiquée dans le **Tableau 1**. La **Figure 41** représente la proportion des espèces majeures de CL présentes dans les quatre lignées cellulaires étudiées. Nos résultats montrent que certaines espèces de CL ne semblent présentes que dans les cellules non-cancéreuses MCF-10A (CL riches en 70 :7, 72 :7, 72 :8 et 74 :8). A l'inverse, certaines espèces de CL sont principalement retrouvées dans les cellules cancéreuses (68 :5, 70 :4, 70 :5, 72 :4, 72 :5). L'espèce 64 :4 CL étant même présente uniquement dans les cellules MCF-7 et MCF-7dox. De façon intéressante, la proportion de 72 :4 est augmentée dans les MDA-MB-231 de façon significative par rapport aux lignées non-cancéreuses et aux lignées MCF-7 et MCF-dox (**Figure 41**). L'espèce 72 :5 CL est significativement augmentée dans les cellules MCF-7dox résistantes et MDA-MB-231 métastatiques par rapport aux cellules non-cancéreuses et aux cellules sensibles. Les espèces 64 :4 et 68 :5 sont principalement présentes dans les lignées MCF-7 et MCF-7dox (**Figure 41**).

L'ensemble de ces résultats montrent une modification de la nature des CL dans les cellules cancéreuses du sein. La quantité des espèces contenant des acides gras polyinsaturés (AGPI) est diminuée dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules non cancéreuses. De plus, il semble que la longueur de chaîne des acides gras soit plus importante dans les cellules non-cancéreuses par rapport aux cellules cancéreuses. De même la longueur de chaîne des acides gras est plus importante dans les cellules « métastatiques » MDA-MB-231 en comparaison des cellules « non-métastatiques » MCF-7 et MCF-7dox.

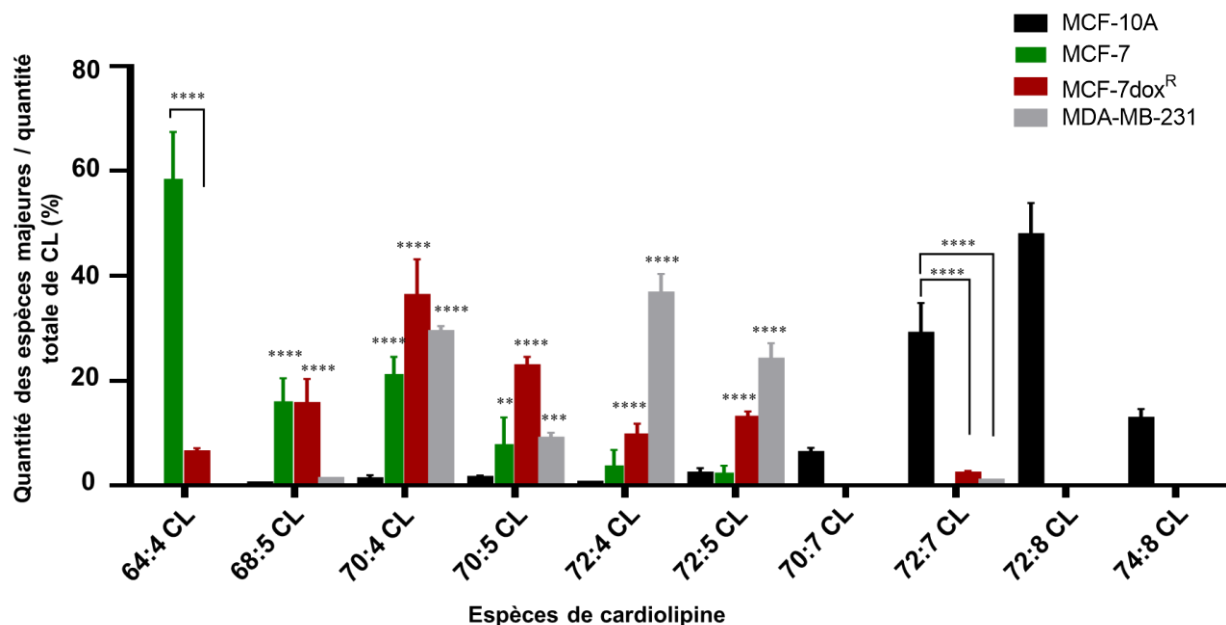


Figure 41. Représentation des espèces majeures de CL détectées par spectrométrie de masse. Les résultats sont présentés en pourcentage des espèces par rapport à la quantité totale des CL. Résultats sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$, $N=6$.

Espèce de cardiolipine	Composition en acide gras
64:4 CL	(16:1)(16:1)(16:1)(16:1)
68:5 CL	(16:1)(18:1)(18:2)(16:1)
70:4 CL	(16:1)(18:1)(18:1)(18:1)
70:5 CL	(16:1)(18:1)(18:2)(18:1)
72:4 CL	(18:1)(18:1)(18:1)(18:1)
72:5 CL	(18:1)(18:1)(18:1)(18:2)
70:7 CL	(16:1)(18:2)(18:2)(18:2)
72:7 CL	(18:1)(18:2)(18:2)(18:2)
72:8 CL	(18:2)(18:2)(18:2)(18:2)
74:8 CL	(18:2)(18:2)(18:1)(20:3)

Tableau 3. Identification des espèces de cardiolipines.

(16 :1) ; acide palmitoléique, (18 :1) ; acide oléique, (18 :2) ;
acide linoléique, (20 :3) ; Acide homo- γ -linolénique

3. La quantité de CL riches en acide linoléique est diminuée et celle en acide oléique est augmentée dans les cellules cancéreuses mammaires par rapport aux cellules non cancéreuses

L'analyse en détail des différentes espèces de CL a révélé une modification remarquable dans le nombre d'insaturation des acides gras de la chaîne latérale. Dans les cellules MCF-10A, les CL sont majoritairement composés d'acide linoléique (18 :2) qui représente ainsi 80% des acides gras. A l'inverse la quantité de CL riches en acide linoléique est très faible dans les cellules cancéreuses mammaires. L'acide linoléique représente ainsi uniquement 6% des acides gras des CL dans les MCF-7, 12% dans les MCF-7dox et 8% dans les MDA-MB-231 (**Figure 42A**).

De façon intéressante, cette diminution en 18 :2 observée dans les cellules cancéreuses mammaires est accompagnée d'une augmentation en acide oléique, qui est présent en quantité négligeable dans les cellules non-cancéreuses MCF-10A (**Figure 42B**). Ainsi, l'acide oléique représente uniquement 10% de tous les acides gras composant les CL dans les cellules MCF-10A, alors qu'il représente 22%, 60% et 80% des acides gras dans les cellules MCF-7, MCF-7dox et MDA-MB-231 respectivement (**Figure 42B**).

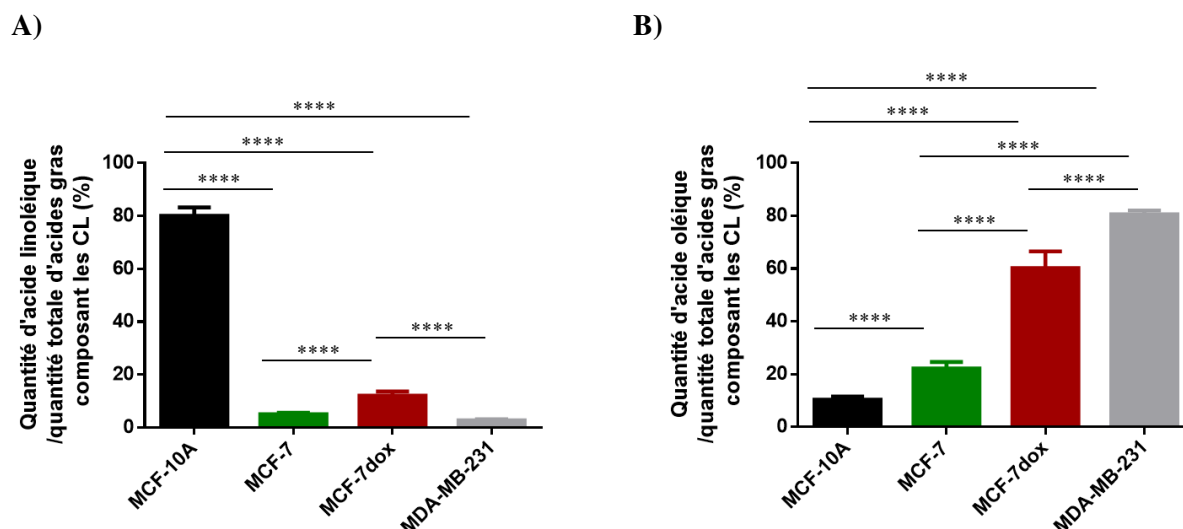


Figure 42. Composition des CL en acide linoléique (A) et acide oléique (B). Les résultats sont présentés en pourcentage de l'acide gras étudié par rapport à la quantité totale des acides gras composant les CL. Résultats sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, **** $p \leq 0,0001$, N=6.

Discussion

En tant que signature phospholipidique des mitochondries, la CL joue un rôle clé dans la stabilité et l'intégrité de la structure et de la fonction mitochondriales. Il existe de plus en plus de preuves que la reprogrammation du métabolisme de la CL existe dans le cancer. Cependant, il faut déterminer si et comment la CL (via la résistance aux médicaments antitumoraux, la croissance tumorale ou les métastases) influence réellement le cancer.

Nos résultats montrent que la quantité des CL n'est pas différent entre les cellules non cancéreuses MCF-10A et les cellules cancéreuses mammaires sensibles MCF-7. Cependant, la quantité des CL est diminué dans les cellules cancéreuses mammaires résistantes à la DOX par rapport aux cellules sensibles MCF-7 et les cellules non-cancéreuses MCF-10A. Cette observation suggère que la diminution de la quantité des CL pourrait jouer un rôle dans les mécanismes impliqués dans la chimiorésistance. Ceci est, notamment, envisageable via la régulation de l'apoptose puisque les CL seraient impliqués dans la transduction des signaux apoptotiques en interagissant avec les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Zhang and Saghatelian 2013). Néanmoins, ces résultats sont très préliminaires et hypothétiques puisque nous avons observé que les cellules MCF-7dox sont résistantes à la molécule BH3 mimétique S63, capable de se fixer sur la protéine anti-apoptotique MCL-1, mais que le KO-TAZ ne modifie pas cette résistance.

La modification de la quantité des CL ne semble pas être impliqué dans les processus de migration ou d'invasion du cancer du sein puisque nos résultats ne montrent pas une modification de la quantité des CL entre les cellules non cancéreuses et les cellules métastatiques MDA-MB-231. Ceci irait dans le même sens que nos résultats obtenus avec les KO-TAZ où nous ne retrouvons aucun effet sur la migration des cellules MDA-MB-231.

De manière très intéressante, nos résultats montrent que la composition en acides gras des CL permettrait de différencier les cellules cancéreuses des cellules non-cancéreuses. Dans les cellules non-cancéreuses MCF-10A, les espèces de CL détectées sont principalement riches en AGPI. La présence de ces insaturations en plus grande nombre pourrait rendre ces cellules non cancéreuses plus sensibles aux ERO que les cellules cancéreuses. Cette susceptibilité moindre à la peroxydation des CL dans les cellules cancéreuses pourrait, à l'inverse, avoir un effet bénéfique pour ces cellules en diminuant la susceptibilité à l'apoptose via une moindre libération du cytochrome c. La génération robuste des ERO est un mécanisme commun pour divers médicaments anticancéreux afin d'éliminer les cellules cancéreuses (Mukhopadhyay et al. 2009; Xie et al. 2016). Cependant, très peu d'études ont considéré les rôles cruciaux joués par les produits de peroxydation lipidique produits par les ERO. Des

études précédentes au sein de notre laboratoire ont indiqué que certains AGPI, comme l'acide docosahexaénoïque (DHA), pourraient sensibiliser les cellules MCF-7dox à la DOX. L'effet cytotoxique du traitement combiné semble être dû à l'induction de l'apoptose, précédée par une augmentation de la génération de produits de peroxydation lipidique intracellulaire, puisque l'utilisation d'un agent anti-oxydant, MitoTEMPO, a partiellement annulé l'effet chimio sensibilisant du DHA dans les cellules MCF-7dox. Dans une mitochondrie de cellule saine, il a été observé que lorsque les CL étaient principalement riches en acides gras saturés ou monoinsaturés à chaîne plus courte cela indiquait des CL immatures, et qu'à l'inverse quand elles étaient essentiellement riches en AGPI à chaîne plus longue, cela indiquait des CL matures (Schlame and Greenberg 2017). Nos résultats suggèrent que dans les cellules cancéreuses, les CL sont majoritairement immatures puisque la quantité de CL riches en acide linoléique diminue alors que la quantité de CL riches en acide oléique augmente. De plus nous avons remarqué que l'augmentation de la quantité d'acide oléique (72 :4 CL et 72 :5 CL) semble corrélée positivement avec les caractéristiques agressives des cellules cancéreuses puisqu'il est augmenté de manière croissante dans les cellules MCF-7 sensible, les cellules MCF-7dox résistantes et enfin les cellules MDA-MB-231 métastatiques. Au contraire, les deux espèces 64 :4 CL et 68 :5 CL, riches en acide palmitoléique, sont uniquement présentes dans les cellules MCF-7 et MCF-7dox. De façon intéressante, l'espèce 64 :4 CL est significativement plus élevée dans les cellules sensibles MCF-7 par rapport aux cellules résistantes. Cette observation suggère un lien entre l'abondance de l'acide palmitoléique et la résistance des cellules cancéreuses du sein.

En conclusion, ces résultats suggèrent que le profil des CL permettrait de différencier les cellules cancéreuses mammaires par rapport aux cellules non-cancéreuses. De même, il serait aussi possible de différencier les lignées cancéreuses sensible, résistante et « métastatique ». Ainsi, les CL des cellules cancéreuses auraient un profil plutôt « immature » avec une diminution des AGPI. Par ailleurs, la présence importante d'acide gras monoinsaturé à chaîne plus longue (18 :1) semble être associé positivement avec le niveau d'agressivité plus élevé des cellules cancéreuses, tandis que, la quantité plus importante d'acides gras plus court (16 :1) semble être associé négativement avec le niveau d'agressivité des cellules cancéreuses. Dans la condition où les enzymes du métabolisme des CL sont fonctionnelles, le profil de la CL peut varier en fonction de la disponibilité des chaînes d'acyle gras dans l'environnement et peut, ainsi, être manipulé par la supplémentation en lipides dans le milieu de culture cellulaire (Ting, Chao, and Hsu 2015). De ce fait, il est possible que le traitement avec les AGPI, en modifiant la composition des CL, puisse affecter les capacités migratoire/invasion des cellules MDA-MB-231 comme il a été précédemment montré (Wannous et al. 2015). Il

sera également intéressant d'étudier les effets d'un traitement avec de l'acide palmitoléique (16 :1) dans ces cellules afin de voir si la présence de cet acide gras dans les CL atténue le caractère agressif des cellules. De même, l'effet de traitements avec de l'acide oléique sur les cellules non cancéreuses et les cellules sensibles pourrait être envisagé afin de mieux comprendre le rôle de cet acide gras dans la résistance/invasion du cancer du sein.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES

Le premier objectif de ma thèse était de comprendre le lien entre la mitophagie, les ERO mitochondriaux et le fonctionnement mitochondrial dans la réponse des cellules cancéreuses mammaires à la DOX.

Nos résultats montrent que, dans les cellules cancéreuses mammaires résistantes à la DOX (MCF-7dox)

- 1- Les mitochondries semblent moins fonctionnelles puisque l'activité et l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire sont altérés et le métabolisme énergétique de la cellule est reprogrammé vers un métabolisme glycolytique plus élevé
- 2- La production mitochondriale des ERO est augmentée et associée à une expression plus élevée de HIF-1 alpha
- 3- La mitophagie est activée par le traitement à la DOX et cet effet est atténué en présence d'un antioxydant ciblant la mitochondrie.

Néanmoins, il semble très important d'étudier s'il existe réellement un lien de causalité entre l'augmentation de la mitophagie par la DOX et la chimiorésistance des MCF-7dox à cette drogue. BNIP3 et NIX sont contrôlés transcriptionnellement par HIF-1 alpha. Néanmoins, il est très peu probable que BNIP3 et NIX soient impliqués dans l'induction de la mitophagie observée dans les MCF-7dox. En effet, l'utilisation du CoCl₂ induit bien une augmentation de l'expression de ces deux protéines mais ne modifie pas la formation des autophagolysosomes dans les cellules MCF-7dox (**Figure 46A et Figure 46B, données supplémentaires**). De plus, le niveau de la protéine BNIP3 n'est pas augmenté après un traitement avec de la DOX.

Une autre voie d'activation de la mitophagie est médiée par la voie PINK-1 / Parkin. Nos résultats supplémentaires ont montré que la quantité de la protéine PINK-1 est plus élevée dans les cellules MCF-7dox par rapport aux cellules sensibles (**Figure 47A, données supplémentaires**). Cependant, le FCCP n'est pas capable d'augmenter la quantité de protéine PINK-1 dans les cellules résistantes à la DOX. De plus, la colocalisation des mitochondries avec des lysosomes n'est pas modifiée par le FCCP dans ces cellules (**Figure 47B, données supplémentaires**). Finalement, nos résultats montrent que l'inhibition transitoire de PINK-1 ne modifie pas la résistance des MCF-7dox à la DOX excluant ainsi implication de la voie PINK-1 dans la résistance à la DOX (**Figure 47C et Figure 47D, données supplémentaires**).

De façon intéressante, le co-traitement de la DOX avec du mitoTEMPO (anti-oxydant mitochondrial) a diminué la colocalisation des mitochondries avec les lysosomes par rapport au traitement DOX seul, suggérant que les ERO sont impliqués dans l'activation de la mitophagie

en réponse à la DOX. De ce fait, nous pouvons supposer que le traitement DOX est associée à une augmentation de la production mitochondriale des ERO via son cycle redox, responsable, au moins en partie, de l'activation de la mitophagie (**Figure 45**). Les ERO jouent un rôle très important dans la régulation de HIF-1 alpha. Il apparaît nécessaire de continuer l'étude de cette voie, par exemple en inhibant HIF-1 alpha par la technique du si-RNA. Ceci permettrait notamment d'expliquer pourquoi la mitophagie n'est pas stimulée de base dans les MCF-7dox.

Le deuxième objectif de ma thèse était d'étudier le rôle du métabolisme des CL, en particulier de la TAZ, dans la chimiorésistance associée au cancer du sein. Nos résultats ont montré que dans les cellules MCF-7dox le métabolisme des CL est modifié avec notamment une altération du fonctionnement de la TAZ conduisant ainsi à une modification de la quantité et de la composition des CL. Nos résultats suggèrent également que seule la TAZ jouerait un rôle prépondérant dans le métabolisme des CL des cellules cancéreuses mammaires étudiées et permettrait de maintenir un métabolisme des CL particulier dans ces cellules. Nos résultats montrent que l'invalidation de la TAZ diminue la sensibilité des cellules MCF-7 à la DOX. Cependant, nous n'avons pas observé le même effet dans les cellules MDA-MB-231. L'invalidation de la TAZ entraîne la disparition totale de l'espèce 70 :4 dans les MDA-MB-231 KO-TAZ et sans modification de cette espèce dans les MCF-7 KO-TAZ. Il pourrait être intéressant d'approfondir le rôle de cette espèce de CL dans la sensibilité à la DOX. Par ailleurs, cela pose la question de savoir quel est le paramètre le plus important entre les changements de quantité ou de composition des CL dans le lien avec la chimiorésistance. Il sera donc intéressant d'étudier les effets de changement de la quantité des CL indépendamment de sa composition ou inversement. Cependant, il semble plus compliqué de modifier la quantité des CL sans avoir un effet sur sa composition. Nous avons déjà observé que l'utilisation de complexes APO-A1/CL permettait de modifier la composition des CL sans changement de la quantité totale des CL (**Figure 48, données supplémentaires**). Cette technique permettra d'approfondir le rôle de la composition des CL, indépendamment de sa quantité, dans la chimiorésistance à la DOX.

Nos résultats montrent que la diminution de la quantité des CL et la modification de leur composition en acides gras liée à l'invalidation de la TAZ ne modifient pas les métabolismes énergétiques total (glycolyse anaérobie) et mitochondrial (consommation d'oxygène et production d'ATP). De même, aucun effet sur l'assemblage des complexes et les supercomplexes de la chaîne respiratoire n'a été observé. Il semble donc que le métabolisme des CL ne joue pas de rôle déterminant dans le métabolisme énergétique mitochondrial dans les cellules cancéreuses mammaires étudiées. Ce résultat qui est contraire au dogme actuel sur le sujet nécessite d'être complété et notamment en regardant spécifiquement le rôle des MLCL, indépendamment des CL. Il n'est pas non plus exclu que l'altération du métabolisme des CL

observée dans les cellules MCF-7dox soit aussi liée, en partie, au dysfonctionnement des complexes OXPHOS qui serait, lui, indépendant des changements de la quantité et de la composition des CL (**Figure 45**). On pourrait imaginer reproduire les anomalies du métabolisme des CL et énergétique mitochondrial et tester les effets sur la sensibilité à la DOX.

Par ailleurs, suite à nos analyses du profil des CL dans les cellules MCF-7 et MCF-7dox, il semble que la présence plus élevée d'acide oléique dans les cellules MCF-7dox est associée avec la résistance de ces cellules à la DOX. Au contraire, la quantité des espèces de CL composées d'acide palmitoléique est significativement plus élevée dans les cellules sensible MCF-7 et suggère que la quantité plus importante d'acide palmitoléique est associée avec les caractéristiques moins agressives des cellules cancéreuses. Il pourrait être intéressant d'étudier les effets de traitement avec de l'acide oléique dans les MCF-7.

Les différents résultats obtenus sont résumés dans les **Figure 43** et **Figure 44**.

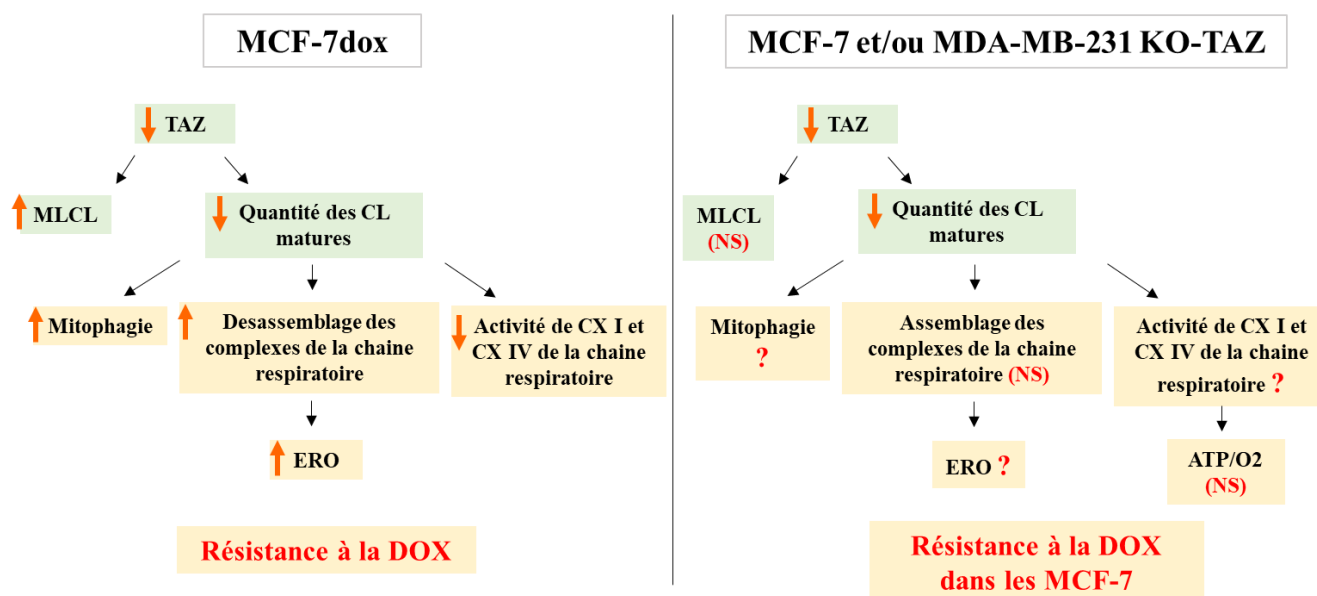


Figure 43. Schéma récapitulatif des résultats obtenus durant la thèse pour les objectifs 1 et 2. (NS) ; les résultats ne sont pas significativement modifiés.

	MCF-7 (sensible)	MCF-7dox (résistante)	MDA-MB-231 (métastatique)
Quantité des CL matures	Pas de différence	Diminution significative	Pas de différence
Composition des CL	↓ AL	↓ AL	↓ AL
	↑ AO +	↑ AO ++	↑ AO +++
	↑ AP	Pas de différence	Pas de différence

Figure 44. Schéma récapitulatif des résultats obtenus durant la thèse pour l'objectif 3. Les résultats sont comparés par rapport aux cellules non-cancéreuses MCF-10A.

Données Supplémentaires

Figure 46 : Effets du CoCl₂ sur l'activité mitophagique des cellules MCF-7dox.

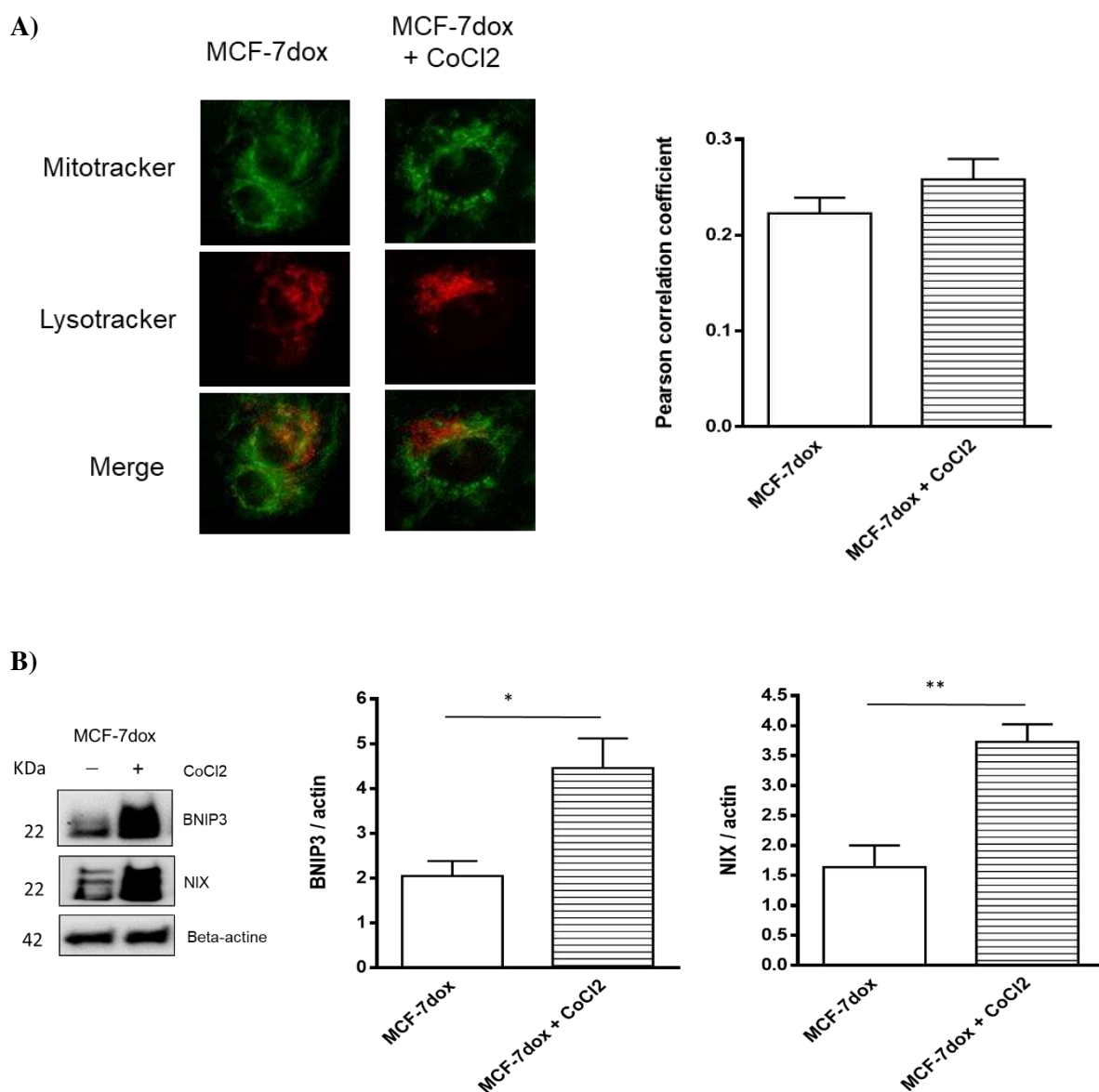
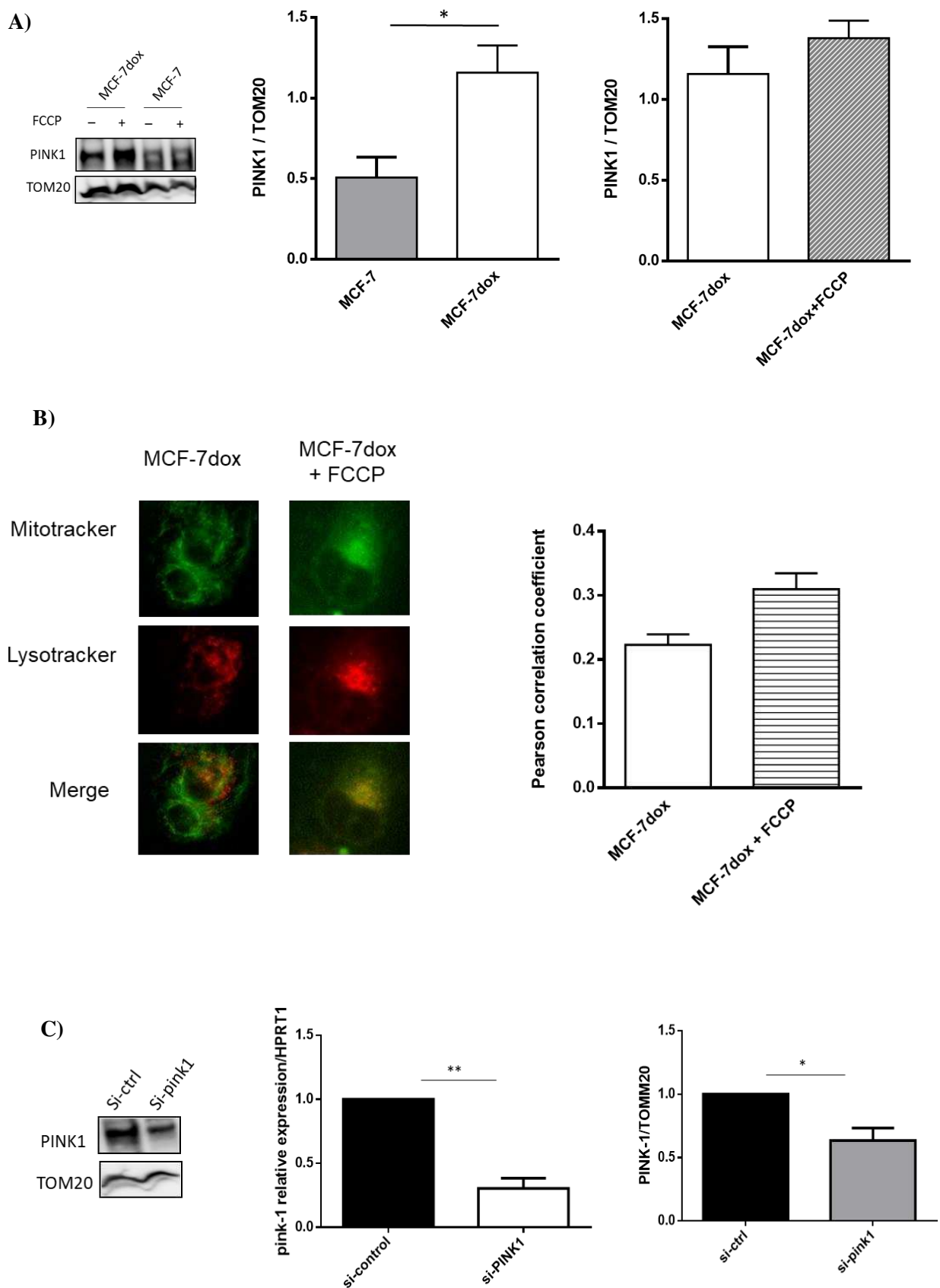


Figure 46. Effet du CoCl₂ sur l'activité mitophagique des cellules MCF-7dox. **A.** Schéma représentatif de la colocalisation des mitochondries/lysosomes observée en microscopie à fluorescence avec un grossissement 400x et la quantification de la colocalisation des mitochondries/lysosomes effectuée en déterminant le coefficient de corrélation de Pearson (r). L'analyse a été réalisée sur trois expériences indépendantes (N=3) sur 10 cellules différentes à chaque fois. **B.** Image représentative d'un Western Blot et Quantification des expressions relatives des protéines BNIP3 et NIX. L'expression des protéines est normalisée par rapport à la β -actine. Résultats sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, ** $p \leq 0,01$, N=6.

Figure 47 : Etude de la voie PINK-1 dans l'activité mitophagique des cellules MCF-7dox.



D)

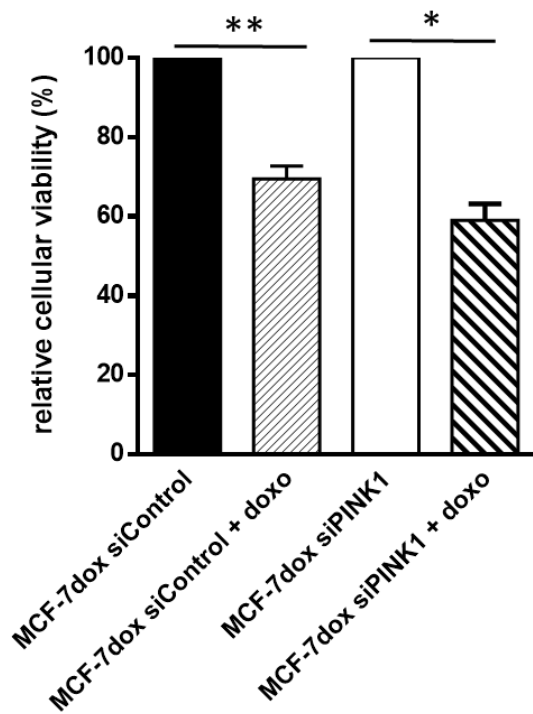
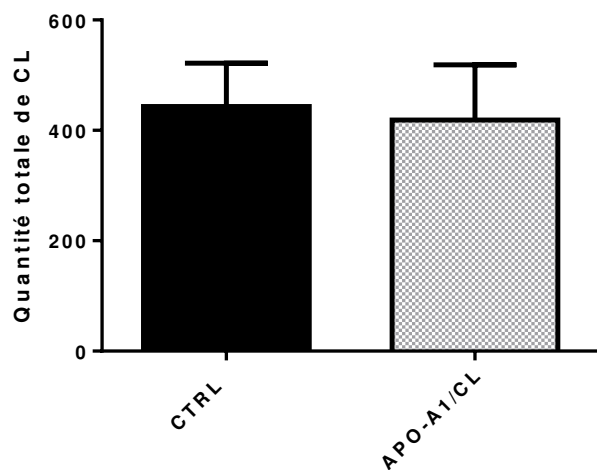


Figure 47. Etude de la voie PINK-1 dans l'activité mitophagique des cellules MCF-7dox. **A.** Image représentative d'un Western Blot et Quantification des expressions relatives de protéine PINK-1. L'expression de protéine est normalisée par rapport à la TOM20. **B.** Schéma représentatif de la colocalisation des mitochondries/lysosomes observée en microscopie à fluorescence avec un grossissement 400x et la quantification de la colocalisation des mitochondries/lysosomes effectuée en déterminant le coefficient de corrélation de Pearson (r). L'analyse a été réalisée sur trois expériences indépendantes (N=3) sur 10 cellules différentes à chaque fois. **C.** Effet d'inhibition de PINK-1 par si-RNA sur l'expression d'ARNm et la quantité de protéine. **D.** Etude de la viabilité des cellules MCF-7dox transfecté par si-PINK-1 en réponse à la doxorubicine. Résultats sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, ** $p \leq 0,01$, N=6.

Figure 48 : Etude du complexe APO-A1/CL sur la quantité et la composition des CL dans les cellules MCF-7dox.

A)



B)

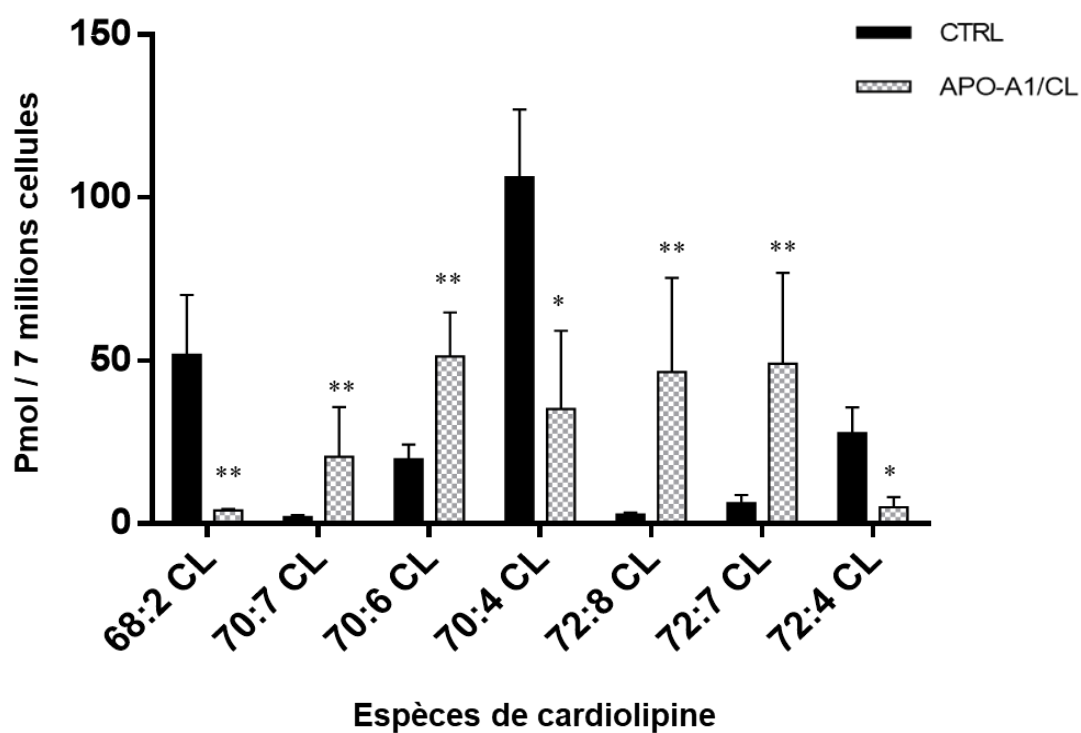


Figure 48. Etude du complexe APO-A1/CL sur la quantité et la composition des CL dans les cellules MCF-7dox. A. Quantité des CL et **B.** la composition des CL étudié par spectrométrie de masse. Résultats sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, N=6.

BIBLIOGRAPHIE

Abdrakhmanov, Alibek, Andrey V. Kulikov, Ekaterina A. Luchkina, Boris Zhivotovsky, and Vladimir Gogvadze

2019 Involvement of Mitophagy in Cisplatin-Induced Cell Death Regulation. *Biological Chemistry* 400(2): 161–170.

Acehan, Devrim, Zaza Khuchua, Riekelt H. Houtkooper, et al.
2009 Distinct Effects of Tafazzin Deletion in Differentiated and Undifferentiated Mitochondria. *Mitochondrion* 9(2): 86–95.

Acehan, Devrim, Yang Xu, David L. Stokes, and Michael Schlame
2007 Comparison of Lymphoblast Mitochondria from Normal Subjects and Patients with Barth Syndrome Using Electron Microscopic Tomography. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 87(1): 40–48.

Alex, Ashley, Eva Bhandary, and Kandace P. McGuire
2020 Anatomy and Physiology of the Breast during Pregnancy and Lactation. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1252: 3–7.

Anderson, Nicole M., Patrick Mucka, Joseph G. Kern, and Hui Feng
2018 The Emerging Role and Targetability of the TCA Cycle in Cancer Metabolism. *Protein & Cell* 9(2): 216–237.

Annesley, Sarah J., and Paul R. Fisher
2019 Mitochondria in Health and Disease. *Cells* 8(7).

Avagliano, Angelica, Maria Rosaria Ruocco, Federica Aliotta, et al.
2019 Mitochondrial Flexibility of Breast Cancers: A Growth Advantage and a Therapeutic Opportunity. *Cells* 8(5).

Banin Hirata, Bruna Karina, Julie Massayo Maeda Oda, Roberta Losi Guembarovski, et al.
2014 Molecular Markers for Breast Cancer: Prediction on Tumor Behavior. *Disease Markers* 2014: 513158.

Bayrhuber, Monika, Thomas Meins, Michael Habeck, et al.
2008 Structure of the Human Voltage-Dependent Anion Channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(40): 15370–15375.

Bean, Jonathan F., Yi-Yong Qiu, Songtao Yu, et al.
2014 Glycolysis Inhibition and Its Effect in Doxorubicin Resistance in Neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery* 49(6): 981–984; discussion 984.

Belevich, Ilya, Michael I. Verkhovsky, and Mårten Wikström
2006 Proton-Coupled Electron Transfer Drives the Proton Pump of Cytochrome c Oxidase. *Nature* 440(7085): 829–832.

Biel, Thomas G., and V. Ashutosh Rao
2018 Mitochondrial Dysfunction Activates Lysosomal-Dependent Mitophagy Selectively in Cancer Cells. *Oncotarget* 9(1): 995–1011.

Bione, S., P. D'Adamo, E. Maestrini, et al.

- 1996 A Novel X-Linked Gene, G4.5. Is Responsible for Barth Syndrome. *Nature Genetics* 12(4): 385–389.
- Bligh, E. G., and W. J. Dyer
1959 A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8): 911–917.
- Bonnet, Sébastien, Stephen L. Archer, Joan Allalunis-Turner, et al.
2007 A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell* 11(1): 37–51.
- Boyd, Kevin J., Nathan N. Alder, and Eric R. May
2018 Molecular Dynamics Analysis of Cardiolipin and Monolysocardiolipin on Bilayer Properties. *Biophysical Journal* 114(9): 2116–2127.
- Bratton, Shawn B., and Guy S. Salvesen
2010 Regulation of the Apaf-1-Caspase-9 Apoptosome. *Journal of Cell Science* 123(Pt 19): 3209–3214.
- Bridges, Hannah R., Andrew J. Y. Jones, Michael N. Pollak, and Judy Hirst
2014 Effects of Metformin and Other Biguanides on Oxidative Phosphorylation in Mitochondria. *The Biochemical Journal* 462(3): 475–487.
- Campbell, Kirsteen J., and Stephen W. G. Tait
2018 Targeting BCL-2 Regulated Apoptosis in Cancer. *Open Biology* 8(5).
- Chaanine, Antoine H., Erik Kohlbrenner, Scott I. Gamb, et al.
2016 FOXO3a Regulates BNIP3 and Modulates Mitochondrial Calcium, Dynamics, and Function in Cardiac Stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 311(6). American Physiological Society: H1540–H1559.
- Chan, David C.
2012 Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health. *Annual Review of Genetics* 46: 265–287.
- Chen, Hsiuchen, Scott A. Detmer, Andrew J. Ewald, et al.
2003 Mitofusins Mfn1 and Mfn2 Coordinately Regulate Mitochondrial Fusion and Are Essential for Embryonic Development. *The Journal of Cell Biology* 160(2): 189–200.
- Chen, Mei, Yuan Zhang, and Peng-Sheng Zheng
2017 Tafazzin (TAZ) Promotes the Tumorigenicity of Cervical Cancer Cells and Inhibits Apoptosis. *PloS One* 12(5): e0177171.
- Chen, Ming, Ziheng Chen, Yueying Wang, et al.
2016 Mitophagy Receptor FUNDC1 Regulates Mitochondrial Dynamics and Mitophagy. *Autophagy* 12(4): 689–702.
- Chourasia, Aparajita H., Michelle L. Boland, and Kay F. Macleod
2015 Mitophagy and Cancer. *Cancer & Metabolism* 3: 4.
- Chu, Charleen T., Hülya Bayır, and Valerian E. Kagan
2014 LC3 Binds Externalized Cardiolipin on Injured Mitochondria to Signal Mitophagy in Neurons. *Autophagy* 10(2). Taylor & Francis: 376–378.

Chu, Charleen T., Jing Ji, Ruben K. Dagda, et al.
2013 Cardiolipin Externalization to the Outer Mitochondrial Membrane Acts as an Elimination Signal for Mitophagy in Neuronal Cells. *Nature Cell Biology* 15(10): 1197–1205.

Cipolat, Sara, Olga Martins de Brito, Barbara Dal Zilio, and Luca Scorrano
2004 OPA1 Requires Mitofusin 1 to Promote Mitochondrial Fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(45): 15927–15932.

Clarke, Robert, Fabio Leonessa, and Bruce Trock
2005 Multidrug Resistance/P-Glycoprotein and Breast Cancer: Review and Meta-Analysis. *Seminars in Oncology* 32(6 Suppl 7): S9-15.

Claypool, Steven M., Pinmanee Boonthung, J. Michael McCaffery, Joseph A. Loo, and Carla M. Koehler
2008 The Cardiolipin Transacylase, Tafazzin, Associates with Two Distinct Respiratory Components Providing Insight into Barth Syndrome. *Molecular Biology of the Cell* 19(12): 5143–5155.

Claypool, Steven M., J. Michael McCaffery, and Carla M. Koehler
2006 Mitochondrial Mislocalization and Altered Assembly of a Cluster of Barth Syndrome Mutant Tafazzins. *The Journal of Cell Biology* 174(3): 379–390.

Comerford, Katrina M., Timothy J. Wallace, Jörn Karhausen, et al.
2002 Hypoxia-Inducible Factor-1-Dependent Regulation of the Multidrug Resistance (MDR1) Gene. *Cancer Research* 62(12). American Association for Cancer Research: 3387–3394.

Comşa, Şerban, Anca Maria Cîmpean, and Marius Raica
2015 The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 Years of Experience in Research. *Anticancer Research* 35(6): 3147–3154.

Cristofani, Riccardo, Marina Montagnani Marelli, Maria Elena Cicardi, et al.
2018 Dual Role of Autophagy on Docetaxel-Sensitivity in Prostate Cancer Cells. *Cell Death & Disease* 9(9): 889.

Dartier, Julie, Elsa Lemaitre, Igor Chourpa, et al.
2017 ATP-Dependent Activity and Mitochondrial Localization of Drug Efflux Pumps in Doxorubicin-Resistant Breast Cancer Cells. *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects* 1861(5 Pt A): 1075–1084.

Deng, Rong, Hai-Liang Zhang, Jun-Hao Huang, et al.
2020 MAPK1/3 Kinase-Dependent ULK1 Degradation Attenuates Mitophagy and Promotes Breast Cancer Bone Metastasis. *Autophagy*: 1–19.

Dhingra Rimpay, Gang Hongying, Wang Yan, et al.
2013 Bidirectional Regulation of Nuclear Factor- κ B and Mammalian Target of Rapamycin Signaling Functionally Links Bnip3 Gene Repression and Cell Survival of Ventricular Myocytes. *Circulation: Heart Failure* 6(2). American Heart Association: 335–343.

Duncan, Anna L.
2020 Monolysocardiolipin (MLCL) Interactions with Mitochondrial Membrane Proteins. *Biochemical Society Transactions* 48(3): 993–1004.

Efremov, Rouslan G., Rozbeh Baradaran, and Leonid A. Sazanov
2010 The Architecture of Respiratory Complex I. *Nature* 465(7297). Nature Publishing Group: 441–445.

Fairchild, C. R., S. P. Ivy, C. S. Kao-Shan, et al.
1987 Isolation of Amplified and Overexpressed DNA Sequences from Adriamycin-Resistant Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 47(19): 5141–5148.

Farge, Thomas, Estelle Saland, Fabienne de Toni, et al.
2017 Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discovery* 7(7). American Association for Cancer Research: 716–735.

Feng, Hai-Ming, Ye Zhao, Jian-Ping Zhang, et al.
2018 Expression and Potential Mechanism of Metabolism-Related Genes and CRLS1 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology Letters* 15(2): 2661–2668.

Finkel, Toren
2012 Signal Transduction by Mitochondrial Oxidants. *The Journal of Biological Chemistry* 287(7): 4434–4440.

Fu, Yibo, Francesca Ricciardiello, Gang Yang, et al.
2021 The Role of Mitochondria in the Chemoresistance of Pancreatic Cancer Cells. *Cells* 10(3). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7996512/>, accessed May 5, 2021.

Fujiwara, M., H. Marusawa, H.-Q. Wang, et al.
2008 Parkin as a Tumor Suppressor Gene for Hepatocellular Carcinoma. *Oncogene* 27(46): 6002–6011.

Geisler, Sven, Kira M. Holmström, Diana Skujat, et al.
2010 PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy Is Dependent on VDAC1 and P62/SQSTM1. *Nature Cell Biology* 12(2): 119–131.

Gkikas, Ilias, Konstantinos Palikaras, and Nektarios Tavernarakis
2018 The Role of Mitophagy in Innate Immunity. *Frontiers in Immunology* 9. *Frontiers*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01283/full>, accessed May 7, 2021.

Glab, Jason Andrew, Zhipeng Cao, and Hamsa Puthalakath
2020 Bcl-2 Family Proteins, beyond the Veil. *International Review of Cell and Molecular Biology* 351: 1–22.

Goldhirsch, A., W. C. Wood, A. S. Coates, et al.
2011 Strategies for Subtypes--Dealing with the Diversity of Breast Cancer: Highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 22(8): 1736–1747.

Gottesman, Michael M., Tito Fojo, and Susan E. Bates
2002 Multidrug Resistance in Cancer: Role of ATP-Dependent Transporters. *Nature Reviews. Cancer* 2(1): 48–58.

Green, Douglas R., and Guido Kroemer

- 2004 The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science* (New York, N.Y.) 305(5684): 626–629.
- Gu, Zhiming, Fredoen Valianpour, Shuliang Chen, et al. 2004 Aberrant Cardiolipin Metabolism in the Yeast Taz1 Mutant: A Model for Barth Syndrome. *Molecular Microbiology* 51(1): 149–158.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg 2011 Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* 144(5): 646–674.
- Heiden, Matthew G. Vander, Lewis C. Cantley, and Craig B. Thompson 2009 Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324(5930). American Association for the Advancement of Science: 1029–1033.
- Hensley, Christopher T., Brandon Faubert, Qing Yuan, et al. 2016 Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. *Cell* 164(4). Elsevier: 681–694.
- Hijikata, Atsushi, Kei Yura, Osamu Ohara, and Mitiko Go 2015 Structural and Functional Analyses of Barth Syndrome-Causing Mutations and Alternative Splicing in the Tafazzin Acyltransferase Domain. *Meta Gene* 4: 92–106.
- Hirsch, Heather A., Dimitrios Iliopoulos, Philip N. Tschlis, and Kevin Struhl 2009 Metformin Selectively Targets Cancer Stem Cells, and Acts Together with Chemotherapy to Block Tumor Growth and Prolong Remission. *Cancer Research* 69(19): 7507–7511.
- Horvath, Susanne E., and Günther Daum 2013 Lipids of Mitochondria. *Progress in Lipid Research* 52(4): 590–614.
- Hou, Hailing, Puchun Er, Jingjing Cheng, et al. 2017 High Expression of FUNDC1 Predicts Poor Prognostic Outcomes and Is a Promising Target to Improve Chemoradiotherapy Effects in Patients with Cervical Cancer. *Cancer Medicine* 6(8): 1871–1881.
- Ikon, Nikita, and Robert O. Ryan 2017 Cardiolipin and Mitochondrial Cristae Organization. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes* 1859(6): 1156–1163.
- Jamieson, David, and Alan V. Boddy 2011 Pharmacogenetics of Genes across the Doxorubicin Pathway. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 7(10). Taylor & Francis: 1201–1210.
- Kaback, H. R. 1980 Electrochemical Ion Gradients and Active Transport. *Annals of the New York Academy of Sciences* 339: 53–60.
- Kagan, V. E., J. Jiang, Z. Huang, et al. 2016 NDPK-D (NM23-H4)-Mediated Externalization of Cardiolipin Enables Elimination of Depolarized Mitochondria by Mitophagy. *Cell Death and Differentiation* 23(7): 1140–1151.
- Kagan, V. E., Y. Y. Tyurina, H. Bayir, et al. 2006 The “pro-Apoptotic Genies” Get out of Mitochondria: Oxidative Lipidomics and Redox

- Activity of Cytochrome c/Cardiolipin Complexes. *Chemico-Biological Interactions* 163(1–2): 15–28.
- Kagan, Valerian E., Charleen T. Chu, Yulia Y. Tyurina, Amin Cheikhi, and Hülya Bayir
2014 Cardiolipin Asymmetry, Oxidation and Signaling. *Chemistry and Physics of Lipids* 179: 64–69.
- Kagan, Valerian E., Vladimir A. Tyurin, Jianfei Jiang, et al.
2005 Cytochrome c Acts as a Cardiolipin Oxygenase Required for Release of Proapoptotic Factors. *Nature Chemical Biology* 1(4): 223–232.
- Kalyanaraman, Balaraman
2019 Teaching the Basics of the Mechanism of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: Have We Been Barking up the Wrong Tree? *Redox Biology* 29. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6909145/>, accessed March 4, 2021.
- Kiebish, Michael A., Xianlin Han, Hua Cheng, Jeffrey H. Chuang, and Thomas N. Seyfried
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).
- Kim, Aekyong
2010 Modulation of MnSOD in Cancer: Epidemiological and Experimental Evidence. *Toxicological Research* 26(2): 83–93.
- Kim, Tae Woo, Seon-Jin Lee, Young-Jun Park, et al.
2017 Opa-Interacting Protein 5 Modulates Docetaxel-Induced Cell Death via Regulation of Mitophagy in Gastric Cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 39(10): 1010428317733985.
- Koshiba, Takumi, Scott A. Detmer, Jens T. Kaiser, et al.
2004 Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes. *Science (New York, N.Y.)* 305(5685): 858–862.
- Kroemer, Guido, and Jacques Pouyssegur
2008 Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell* 13(6). Elsevier: 472–482.
- Kröger, A., and M. Klingenberg
1973 The Kinetics of the Redox Reactions of Ubiquinone Related to the Electron-Transport Activity in the Respiratory Chain. *European Journal of Biochemistry* 34(2): 358–368.
- Kühlbrandt, Werner
2015 Structure and Function of Mitochondrial Membrane Protein Complexes. *BMC Biology* 13: 89.
- Kuntz, Elodie M., Pablo Baquero, Alison M. Michie, et al.
2017 Targeting Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Eradicates Therapy-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells. *Nature Medicine* 23(10): 1234–1240.
- Lee, Jisun, Samantha Giordano, and Jianhua Zhang
2012 Autophagy, Mitochondria and Oxidative Stress: Cross-Talk and Redox Signalling. *The Biochemical Journal* 441(2): 523–540.

Lee, Kyung-Min, Jennifer M. Giltane, Justin M. Balko, et al. 2017 MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Cell Metabolism* 26(4): 633-647.e7.

Lee, Yong Sun, Yu Yeon Jung, Mi Hee Park, et al. 2018 Deficiency of Parkin Suppresses Melanoma Tumor Development and Metastasis through Inhibition of MFN2 Ubiquitination. *Cancer Letters* 433: 156–164.

Leman, Géraldine, Naïg Gueguen, Valérie Desquirit-Dumas, et al. 2015 Assembly Defects Induce Oxidative Stress in Inherited Mitochondrial Complex I Deficiency. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 65: 91–103.

Lemasters, John J., Tom P. Theruvath, Zhi Zhong, and Anna-Liisa Nieminen 2009 Mitochondrial Calcium and the Permeability Transition in Cell Death. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1787(11): 1395–1401.

Leung, L. K., and T. T. Wang 1999 Differential Effects of Chemotherapeutic Agents on the Bcl-2/Bax Apoptosis Pathway in Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Breast Cancer Research and Treatment* 55(1): 73–83.

Liu, Hailan, Yang Liu, and Jian-Ting Zhang 2008 A New Mechanism of Drug Resistance in Breast Cancer Cells: Fatty Acid Synthase Overexpression-Mediated Palmitate Overproduction. *Molecular Cancer Therapeutics* 7(2): 263–270.

Liu, Hui-juan, Xiao-xiao Jiang, Yi-zhen Guo, et al. 2017 The Flavonoid TL-2-8 Induces Cell Death and Immature Mitophagy in Breast Cancer Cells via Abrogating the Function of the AHA1/Hsp90 Complex. *Acta Pharmacologica Sinica* 38(10). Nature Publishing Group: 1381–1393.

Liu, Lei, Du Feng, Guo Chen, et al. 2012 Mitochondrial Outer-Membrane Protein FUNDC1 Mediates Hypoxia-Induced Mitophagy in Mammalian Cells. *Nature Cell Biology* 14(2): 177–185.

Liu, Yifeng, Yulin Jiang, Nian Wang, et al. 2017 Invalidation of Mitophagy by FBP1-Mediated Repression Promotes Apoptosis in Breast Cancer. *Tumor Biology* 39(6). SAGE Publications Ltd STM: 1010428317708779.

MacKeigan, Jeffrey P., Leon O. Murphy, and John Blenis 2005 Sensitized RNAi Screen of Human Kinases and Phosphatases Identifies New Regulators of Apoptosis and Chemoresistance. *Nature Cell Biology* 7(6): 591–600.

Maes, H., S. Van Eygen, D. V. Krysko, et al. 2014 BNIP3 Supports Melanoma Cell Migration and Vasculogenic Mimicry by Orchestrating the Actin Cytoskeleton. *Cell Death & Disease* 5: e1127.

Magder, Sheldon 2006 Reactive Oxygen Species: Toxic Molecules or Spark of Life? *Critical Care* 10(1): 208.

Makrecka-Kuka, Marina, Gerhard Krumschnabel, and Erich Gnaiger

2015 High-Resolution Respirometry for Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria. *Biomolecules* 5(3): 1319–1338.

Mao, Kai, Ke Wang, Xu Liu, and Daniel J. Klionsky
2013 The Scaffold Protein Atg11 Recruits Fission Machinery to Drive Selective Mitochondria Degradation by Autophagy. *Developmental Cell* 26(1): 9–18.

Mao, Y., C. Yu, T. S. Hsieh, et al.
1999 Mutations of Human Topoisomerase II Alpha Affecting Multidrug Resistance and Sensitivity. *Biochemistry* 38(33): 10793–10800.

Margoliash, E., S. Ferguson-Miller, J. Tulloss, et al.
1973 Separate Intramolecular Pathways for Reduction and Oxidation of Cytochrome c in Electron Transport Chain Reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(11): 3245–3249.

McStay, Gavin P., Samantha J. Clarke, and Andrew P. Halestrap
2002 Role of Critical Thiol Groups on the Matrix Surface of the Adenine Nucleotide Translocase in the Mechanism of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *The Biochemical Journal* 367(Pt 2): 541–548.

Medja, F., S. Allouche, P. Frachon, et al.
2009 Development and Implementation of Standardized Respiratory Chain Spectrophotometric Assays for Clinical Diagnosis. *Mitochondrion* 9(5): 331–339.

Mitchell, Peter
2011 Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. 1966. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1807(12): 1507–1538.

Moreno-Sánchez, Rafael, Sara Rodríguez-Enríquez, Alvaro Marín-Hernández, and Emma Saavedra
2007 Energy Metabolism in Tumor Cells. *The FEBS Journal* 274(6): 1393–1418.

Mukherjee, A., M. Shehata, P. Moseley, et al.
2010 Topo2 α Protein Expression Predicts Response to Anthracycline Combination Neo-Adjuvant Chemotherapy in Locally Advanced Primary Breast Cancer. *British Journal of Cancer* 103(12): 1794–1800.

Mukhopadhyay, Partha, Mohanraj Rajesh, Sándor Bátkai, et al.
2009 Role of Superoxide, Nitric Oxide, and Peroxynitrite in Doxorubicin-Induced Cell Death in Vivo and in Vitro. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 296(5): H1466-1483.

Murphy, Michael P.
2009 How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species. *The Biochemical Journal* 417(1): 1–13.

Musatov, Andrej, and Erik Sedlák
2017 Role of Cardiolipin in Stability of Integral Membrane Proteins. *Biochimie* 142: 102–111.

Novak, Ivana, Vladimir Kirkin, David G McEwan, et al.

- 2010 Nix Is a Selective Autophagy Receptor for Mitochondrial Clearance. *EMBO Reports* 11(1). John Wiley & Sons, Ltd: 45–51.
- Olteanu, Alina, Chetan N. Patel, Matthew M. Dedmon, et al. 2003 Stability and Apoptotic Activity of Recombinant Human Cytochrome c. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312(3): 733–740.
- Ott, M., B. Zhivotovsky, and S. Orrenius 2007 Role of Cardiolipin in Cytochrome c Release from Mitochondria. *Cell Death and Differentiation* 14(7): 1243–1247.
- Palikaras, Konstantinos, and Nektarios Tavernarakis 2014 Mitochondrial Homeostasis: The Interplay between Mitophagy and Mitochondrial Biogenesis. *Experimental Gerontology* 56: 182–188.
- Palorini, Roberta, Tiziana Simonetto, Claudia Cirulli, and Ferdinando Chiaradonna 2013 Mitochondrial Complex I Inhibitors and Forced Oxidative Phosphorylation Synergize in Inducing Cancer Cell Death. *International Journal of Cell Biology* 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3638674/>, accessed May 6, 2021.
- Pathak, Surajit, Wen-Jian Meng, Hong Zhang, et al. 2014 Tafazzin Protein Expression Is Associated with Tumorigenesis and Radiation Response in Rectal Cancer: A Study of Swedish Clinical Trial on Preoperative Radiotherapy. *PloS One* 9(5): e98317.
- Peetla, Chiranjeevi, Radhika Bhawe, Sivakumar Vijayaraghavalu, et al. 2010 Drug Resistance in Breast Cancer Cells: Biophysical Characterization of and Doxorubicin Interactions with Membrane Lipids. *Molecular Pharmaceutics* 7(6): 2334–2348.
- Petrosillo, Giuseppe, Mariagiuseppa Matera, Nicola Moro, Francesca M. Ruggiero, and Giuseppe Paradies 2009 Mitochondrial Complex I Dysfunction in Rat Heart with Aging: Critical Role of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin. *Free Radical Biology & Medicine* 46(1): 88–94.
- Polyak, Kornelia 2007 Breast Cancer: Origins and Evolution. *The Journal of Clinical Investigation* 117(11). American Society for Clinical Investigation: 3155–3163.
- Poulogiannis, George, Rebecca E. McIntyre, Maria Dimitriadi, et al. 2010 PARK2 Deletions Occur Frequently in Sporadic Colorectal Cancer and Accelerate Adenoma Development in Apc Mutant Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(34): 15145–15150.
- Qian, Xiaoling, Wenxia Xu, Jinye Xu, et al. 2017 Enolase 1 Stimulates Glycolysis to Promote Chemoresistance in Gastric Cancer. *Oncotarget* 8(29). Impact Journals: 47691–47708.
- Ren, Mindong, Colin K. L. Phoon, and Michael Schlame 2014 Metabolism and Function of Mitochondrial Cardiolipin. *Progress in Lipid Research* 55: 1–16.
- Renu, Kaviyarasi, Abilash V.g., Tirupathi Pichiah P.b., and Sankarganesh Arunachalam

2018 Molecular Mechanism of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy – An Update. *European Journal of Pharmacology* 818: 241–253.

Roncuzzi, Laura, Fabia Pancotti, and Nicola Baldini
2014 Involvement of HIF-1 α Activation in the Doxorubicin Resistance of Human Osteosarcoma Cells. *Oncology Reports* 32(1): 389–394.

Santucci, Roberto, Federica Sinibaldi, Paola Cozza, Fabio Polticelli, and Laura Fiorucci
2019 Cytochrome c: An Extreme Multifunctional Protein with a Key Role in Cell Fate. *International Journal of Biological Macromolecules* 136: 1237–1246.

Schlame, Michael, Devrim Acehan, Bob Berno, et al.
2012 The Physical State of Lipid Substrates Provides Transacylation Specificity for Tafazzin. *Nature Chemical Biology* 8(10): 862–869.

Schlame, Michael, and Miriam L. Greenberg
2017 Biosynthesis, Remodeling and Turnover of Mitochondrial Cardiolipin. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862(1): 3–7.

Schwarten, Melanie, Jeannine Mohrlüder, Peixiang Ma, et al.
2009 Nix Directly Binds to GABARAP: A Possible Crosstalk between Apoptosis and Autophagy. *Autophagy* 5(5): 690–698.

Seebacher, Nicole, Darius J. R. Lane, Des R. Richardson, and Patric J. Jansson
2016 Turning the Gun on Cancer: Utilizing Lysosomal P-Glycoprotein as a New Strategy to Overcome Multi-Drug Resistance. *Free Radical Biology & Medicine* 96: 432–445.

Shadel, Gerald S., and Tamas L. Horvath
2015 Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell* 163(3): 560–569.

Shen, Y.-C., D.-L. Ou, C. Hsu, et al.
2013 Activating Oxidative Phosphorylation by a Pyruvate Dehydrogenase Kinase Inhibitor Overcomes Sorafenib Resistance of Hepatocellular Carcinoma. *British Journal of Cancer* 108(1): 72–81.

Si, Lingling, Jianing Fu, Weiwei Liu, et al.
2020 Silibinin-Induced Mitochondria Fission Leads to Mitophagy, Which Attenuates Silibinin-Induced Apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 685: 108284.

Signes, Alba, and Erika Fernandez-Vizarra
2018 Assembly of Mammalian Oxidative Phosphorylation Complexes I-V and Supercomplexes. *Essays in Biochemistry* 62(3): 255–270.

Song, Xianrang, Xianxi Liu, Weiling Chi, et al.
2006 Hypoxia-Induced Resistance to Cisplatin and Doxorubicin in Non-Small Cell Lung Cancer Is Inhibited by Silencing of HIF-1 α Gene. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 58(6): 776–784.

Sousa, Joana S., Edoardo D’Imprima, and Janet Vonck
2018 Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Sub-Cellular Biochemistry* 87: 167–227.

Sowter, Heidi M., Peter J. Ratcliffe, Peter Watson, Arnold H. Greenberg, and Adrian L. Harris

2001 HIF-1-Dependent Regulation of Hypoxic Induction of the Cell Death Factors BNIP3 and NIX in Human Tumors. *Cancer Research* 61(18). American Association for Cancer Research: 6669–6673.

Steffen, Janos, and Carla M. Koehler
2018 ER-Mitochondria Contacts: Actin Dynamics at the ER Control Mitochondrial Fission via Calcium Release. *The Journal of Cell Biology* 217(1): 15–17.

Stroud, David A., Elliot E. Surgenor, Luke E. Formosa, et al.
2016 Accessory Subunits Are Integral for Assembly and Function of Human Mitochondrial Complex I. *Nature* 538(7623): 123–126.

Ting, Hsiu-Chi, Yu-Jen Chao, and Yuan-Hao Howard Hsu
2015 Polyunsaturated Fatty Acids Incorporation into Cardiolipin in H9c2 Cardiac Myoblast. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 26(7): 769–775.

Tracy, Kristin, Benjamin C. Dibling, Benjamin T. Spike, et al.
2007 BNIP3 Is an RB/E2F Target Gene Required for Hypoxia-Induced Autophagy. *Molecular and Cellular Biology* 27(17): 6229–6242.

Tyurina, Yulia Y., Samuel M. Poloyac, Vladimir A. Tyurin, et al.
2014 A Mitochondrial Pathway for Biosynthesis of Lipid Mediators. *Nature Chemistry* 6(6): 542–552.

Vähäheikkilä, Marjut, Tapio Peltomaa, Tomasz Róg, et al.
2018 How Cardiolipin Peroxidation Alters the Properties of the Inner Mitochondrial Membrane? *Chemistry and Physics of Lipids* 214: 15–23.

Van Vranken, Jonathan G., Un Na, Dennis R. Winge, and Jared Rutter
2015 Protein-Mediated Assembly of Succinate Dehydrogenase and Its Cofactors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 50(2): 168–180.

Vannini, I., W. Zoli, A. Tesei, et al.
2008 Role of P53 Codon 72 Arginine Allele in Cell Survival in Vitro and in the Clinical Outcome of Patients with Advanced Breast Cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 29(3): 145–151.

Vara-Perez, Monica, Blanca Felipe-Abrio, and Patrizia Agostinis
2019 Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation. *Cells* 8(5).

Vargo-Gogola, Tracy, and Jeffrey M. Rosen
2007 Modelling Breast Cancer: One Size Does Not Fit All. *Nature Reviews. Cancer* 7(9): 659–672.

Vaz, Frédéric M., Riekelt H. Houtkooper, Fredoen Valianpour, Peter G. Barth, and Ronald J. Wanders
2003 Only One Splice Variant of the Human TAZ Gene Encodes a Functional Protein with a Role in Cardiolipin Metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* 278(44): 43089–43094.

Viale, Andrea, Denise Corti, and Giulio F. Draetta
2015 Tumors and Mitochondrial Respiration: A Neglected Connection. *Cancer Research* 75(18). American Association for Cancer Research: 3687–3691.

- Vianello, Angelo, Valentino Casolo, Elisa Petrusa, et al.
2012 The Mitochondrial Permeability Transition Pore (PTP) - an Example of Multiple Molecular Exaptation? *Biochimica Et Biophysica Acta* 1817(11): 2072–2086.
- Villa, Elodie, Emma Proïcs, Camila Rubio-Patiño, et al.
2017 Parkin-Independent Mitophagy Controls Chemotherapeutic Response in Cancer Cells. *Cell Reports* 20(12): 2846–2859.
- Vinothkumar, Kutti R., Jiapeng Zhu, and Judy Hirst
2014 Architecture of Mammalian Respiratory Complex I. *Nature* 515(7525): 80–84.
- Vreken, P., F. Valianpour, L. G. Nijtmans, et al.
2000 Defective Remodeling of Cardiolipin and Phosphatidylglycerol in Barth Syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279(2): 378–382.
- Walther, Dirk M., and Doron Rapaport
2009 Biogenesis of Mitochondrial Outer Membrane Proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793(1): 42–51.
- Wannous, Ramez, Emeline Bon, Ludovic Gillet, et al.
2015 Suppression of PPAR β , and DHA Treatment, Inhibit NaV1.5 and NHE-1 pro-Invasive Activities. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 467(6): 1249–1259.
- Weinberg, Samuel E., and Navdeep S. Chandel
2015 Targeting Mitochondria Metabolism for Cancer Therapy. *Nature Chemical Biology* 11(1): 9–15.
- Wheaton, William W., Samuel E. Weinberg, Robert B. Hamanaka, et al.
2014 Metformin Inhibits Mitochondrial Complex I of Cancer Cells to Reduce Tumorigenesis. *ELife* 3: e02242.
- Wong, Yvette C., and Erika L. F. Holzbaur
2014 Optineurin Is an Autophagy Receptor for Damaged Mitochondria in Parkin-Mediated Mitophagy That Is Disrupted by an ALS-Linked Mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(42): E4439–4448.
- Wu, Hui-Mei, Li-Jie Shao, Zi-Feng Jiang, and Rong-Yu Liu
2016 Gemcitabine-Induced Autophagy Protects Human Lung Cancer Cells from Apoptotic Death. *Lung* 194(6): 959–966.
- Wu, Wenxian, Weili Tian, Zhe Hu, et al.
2014 ULK1 Translocates to Mitochondria and Phosphorylates FUNDC1 to Regulate Mitophagy. *EMBO Reports* 15(5). John Wiley & Sons, Ltd: 566–575.
- Xie, Y., W. Hou, X. Song, et al.
2016 Ferroptosis: Process and Function. *Cell Death and Differentiation* 23(3): 369–379.
- Xu, Min, Shuzheng Chen, Weibin Yang, et al.
2018 FGFR4 Links Glucose Metabolism and Chemotherapy Resistance in Breast Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 47(1): 151–160.

- Xu, Yang, Murari Anjaneyulu, Alec Donelian, et al.
2019 Assembly of the Complexes of Oxidative Phosphorylation Triggers the Remodeling of Cardiolipin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(23): 11235–11240.
- Xu, Yang, Morgan Condell, Heide Plesken, et al.
2006 A *Drosophila* Model of Barth Syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(31): 11584–11588.
- Xu, Yang, John J. Sutachan, Heide Plesken, Richard I. Kelley, and Michael Schlame
2005 Characterization of Lymphoblast Mitochondria from Patients with Barth Syndrome. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 85(6): 823–830.
- Yan, Chen, Lan Luo, Chang-Ying Guo, et al.
2017 Doxorubicin-Induced Mitophagy Contributes to Drug Resistance in Cancer Stem Cells from HCT8 Human Colorectal Cancer Cells. *Cancer Letters* 388: 34–42.
- Yao, Nan, Chenran Wang, Nan Hu, et al.
2019 Inhibition of PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy Sensitizes Multidrug-Resistant Cancer Cells to B5G1, a New Betulinic Acid Analog. *Cell Death & Disease* 10(3): 232.
- Ye, Cunqi, Zheni Shen, and Miriam L. Greenberg
2016 Cardiolipin Remodeling: A Regulatory Hub for Modulating Cardiolipin Metabolism and Function. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 48(2): 113–123.
- Yin, Jian, Qian Liu, Chao Chen, and Wenxiang Liu
2019 Small Regulatory Polypeptide of Amino Acid Response Negatively Relates to Poor Prognosis and Controls Hepatocellular Carcinoma Progression via Regulating MicroRNA-5581-3p/Human Cardiolipin Synthase 1. *Journal of Cellular Physiology* 234(10): 17589–17599.
- Yoon, Yisang, Eugene W. Krueger, Barbara J. Oswald, and Mark A. McNiven
2003 The Mitochondrial Protein Hfis1 Regulates Mitochondrial Fission in Mammalian Cells through an Interaction with the Dynamin-like Protein DLP1. *Molecular and Cellular Biology* 23(15): 5409–5420.
- Youle, Richard J., and Alexander M. van der Bliek
2012 Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science (New York, N.Y.)* 337(6098): 1062–1065.
- Zhang, Lin, Lihua Ming, and Jian Yu
2007 BH3 Mimetics to Improve Cancer Therapy; Mechanisms and Examples. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 10(6): 207–217.
- Zhang, Teja, and Alan Saghatelian
2013 Emerging Roles of Lipids in BCL-2 Family-Regulated Apoptosis. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1831(10): 1542–1554.
- Zheng, Rong, Qiwei Yao, Guozhu Xie, et al.
2015 TAT-ODD-P53 Enhances the Radiosensitivity of Hypoxic Breast Cancer Cells by Inhibiting Parkin-Mediated Mitophagy. *Oncotarget* 6(19): 17417–17429.

Zhou, Jing, Guobing Li, Yi Zheng, et al.
2015 A Novel Autophagy/Mitophagy Inhibitor Liensinine Sensitizes Breast Cancer Cells to Chemotherapy through DNM1L-Mediated Mitochondrial Fission. *Autophagy* 11(8). Taylor & Francis: 1259–1279.

ANNEXES

Cardiolipin remodeling enzyme tafazzin; potential implication in doxorubicin resistance of breast cancer cells

^{*a} Seyedeh Tayebbeh Ahmadpour, ^a Michelle Pinault, ^a Cyrille Guimaraes, ^b Valérie Desquirit-Dumas, ^a Julie Dartier, ^a Isabelle Domingo, ^c Jérôme Bourgeais, ^d Jean-Paul Pais de Barros, ^b Charlotte Orre, ^b Naïg Gueguen, ^c Olivier Hérault, ^e Laurent Maillet, ^e Sophie Barillé-Nion, ^f Steven Claypool, ^g Grant M. Hatch, ^a Karine Mahéo and ^{*a} Jean-François Dumas

^a Université de Tours, Inserm, Nutrition, Croissance et Cancer UMR1069, 37032, Tours, France.

^b UMR CNRS 6214-INSERM U1083, Angers, France.

^c CNRS ERL7001 LNOX «Leukemic Niche and Redox Metabolism», EA 7501 université de Tours-CHU de Tours, Service d'Hématologie Biologique, 37032 Tours, France.

^d Plateforme de Lipidomique. Inserm UMR1231/LabEx LipSTIC, 21000 Dijon, France

^e Université de Nantes, Inserm, CRCINA, F-44000 Nantes, France.

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

^g Department of Pharmacology and Therapeutics, DREAM Children's Hospital Research Institute of Manitoba, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada.

*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

Seyedeh Tayebbeh Ahmadpour, Inserm UMR1069, Laboratoire de Nutrition, Croissance et Cancer, Faculté de Médecine, Bâtiment Dutrochet, 10 boulevard Tonnellé, F-37032 TOURS, Cedex 1, France. e-mail: st.ahmadpour@gmail.com

Abstract

As the signature phospholipid of mitochondria, cardiolipin (CL) plays a key role in the stability and integrity of mitochondrial structure and function. To date there is very little data on the nature and the biological effects of CL in cancer in the context of clinical studies, especially for breast cancer. Nevertheless, reprogramming of CL metabolism has been observed in several types of cancer and therefore could be a potential therapeutic target. The objective of our study was to investigate the biological role played by CL metabolism, with a special attention to the remodeling enzyme tafazzin (TAZ), in breast cancer cells in the context of doxorubicin (DOX) resistance. Our results show that CL content is decreased, CL composition modified and TAZ content and activity altered in DOX-resistant breast cancer cells (MCF-7dox) in comparison to a sensitive-parental cell line (MCF-7). In addition, TAZ deficiency lead to a substantial change in the content and composition of CL in MCF-7 cells resulting in an “immature CL composition”. Indeed, we found a remarkable increase of CL possessing palmitic acid in its acyl chain and a very significant decrease in the amount of CL with unsaturated fatty acids. Finally, TAZ deficiency decreased DOX sensitivity in MCF-7 cells. In conclusion, our data highlight the importance of the CL remodeling enzyme TAZ in DOX-mediated resistance of breast cancer cells.

Keywords: Mitochondria, cardiolipin, tafazzin, breast cancer, chemoresistance

Abbreviations: CL: cardiolipin, cardiolipin synthase: CLS, TAZ: tafazzin, MLCL: monolyso-cardiolipin, IMM: inner mitochondria membrane, ALCAT1: acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase, MLCLAT1: MLCL acyltransferase 1, OXPHOS: oxidative phosphorylation system, HPTLC: high performance thin layer chromatography, PA: palmitoleic acid, LA: linoleic acid, ATP: adenosine triphosphate.

1. Introduction

As the signature phospholipid of mitochondria, cardiolipin (CL) plays a key role in the stability and integrity of mitochondrial structure and function [1-3]. CL interacts with the proteins of the mitochondrial inner membrane and in particular the enzymes involved in the electron transport chain and the oxidative phosphorylation system, ensuring the organization of mitochondrial cristae, and is therefore essential for many mitochondrial bioenergetic processes. In addition, CL provides mitochondrial quality control by regulating mitochondrial autophagy (mitophagy) [1]. Due to the presence of unsaturated fatty acyl chains, CL is sensitive to oxidative stress. The balance between saturated and unsaturated fatty acyl chains is critical for the regulation of mitochondrial apoptosis, and in particular, response to therapeutic drugs [2].

CL metabolism is divided into two main steps. The first step consists of its biosynthesis via CL synthase (CLS) leading to the formation of immature CL [3]–[6]. This step is then followed by structural modifications called remodeling which starts by removing an acyl chain via the activity of a phospholipase to form monolyso (MLCL)-CL. The MLCL is then reacylated by an acyl transferase to form mature CL [6], [7]. Three enzymatic pathways are involved in CL remodeling. Tafazzin (TAZ) is a transacylase localized on the outer face of the inner mitochondria membrane (IMM) and on the inner surface of the outer membrane and transfers an acyl chain of phosphatidylethanolamine and/or phosphatidylcholine to MLCL, allowing the formation of a fully mature form of CL [6], [8], [9]. TAZ is the enzyme responsible for the majority of CL remodeling under physiological conditions. Mutations in the TFAZZIN gene result in Barth syndrome, a rare X-linked recessive disorder [10]. The TAZ gene is highly conserved from yeast to humans, and yeast *taz1* null mutants show alterations in CL metabolism, mitochondrial dysfunction and destabilization of supercomplexes similar to that found in Barth syndrome [11]. Interestingly, deletion of TAZ, independent of CL composition, significantly decreased the proliferation of C6 glioma cells [12]. The acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase (ALCAT1) and MLCL acyltransferase 1 (MLCLAT1) are two other acyltransferases that reside, respectively, on the endoplasmic reticulum mitochondria-associated membranes and inner leaflet of the IMM. Both ALCAT1 and MLCLAT1 use the acyl chain of acyl-CoAs to ensure MLCL reacylation [13], [14] (For more detail in CL biosynthesis and remodeling see [15]).

To date there is very little data on the nature and the biological effects of CL in cancer in the context of clinical studies, especially for breast cancer. Nevertheless, CL metabolism is reprogrammed in several types of cancer and therefore could be a potential therapeutic target. Studies suggest a tumor suppressing function for CLS [16], [17]. Unlike CLS, other studies suggest a tumorigenic function for TAZ [18-20]. However, whether this tumorigenic effect of

TAZ is always associated and involves changes in the content and composition of CL is not always determined. It is therefore, important to better understand the biological role of CL and/or TAZ in cancer.

In this study, we have investigated the biological role of CL metabolism in doxorubicin (DOX) resistant breast cancer in detail by determining CL parameters such as content and composition of molecular CL species as well as mitochondrial function and cellular viability in response to DOX treatment. Our hypothesis was that the reprogramming of CL metabolism in DOX-resistant cells is a consequence of alteration in the remodeling enzyme, TAZ, and this could play a role in the resistance of breast cancer cells to DOX.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

MCF-7 (DOX sensitive) (Michigan Cancer Foundation-7) and MCF-7dox cells (DOX resistant cells with an IC₅₀ approximately 500 times greater than that of MCF-7 cells) (MCF-7dox cell line was a gift of Dr. K. Cowan (National Cancer Institute, Bethesda, MD) were cultured in DMEM medium 4.5 g/L of glucose (Lonza, France.) supplemented with 5% FBS (Eurobio, Les Ulis, France). The cells are cultured at 37°C with 5% CO₂. The MCF-7dox cells were cultured in the presence of 1 µM of DOX in order to maintain their resistance. Before the experiments, cells were cultured in the absence of DOX for 7 days.

2.2. Deletion of TAZ and ALCAT1 in MCF-7 cells

TAZ and ALCAT1 deficient MCF-7 cells were generated using the CRISPR-Cas9-induced knock-out (KO) cell lines. Single guide (sg) RNA sequences targeting human genes were designed using the CRISPR design tool (<http://crispor.tefor.net>). The guide sequences described in Table 1 were cloned in the plentiCRISPRV2 vector that was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid # 52961) [21]. Cells were selected using 1 µg/mL puromycin and KOs were confirmed by immunoblot analysis. The cell lines were cultured in DMEM 4.5 g / L glucose medium (Lonza, France) containing 5% FBS. All cell lines were grown at 37 ° C in a humidified incubator with 5% CO₂. The culture medium was renewed every 72 hours.

Human TAZ	CGTGAAGTGGCCGTTCCCCG
Human ALCAT1	TAAACCCATCTTGGTATCGC

Table 1: Guide sequences used in CRISPR-Cas9-based generation of deficient cell lines

2.3. Protein extraction

About 5 million cells per condition are obtained after washing with PBS (Lonza, France) and application of trypsin (Eurobio, France). The cells are then centrifuged at x1000 rpm for 5 minutes. The supernatant is removed and the cell pellet is resuspended in lysis buffer (1% triton, 20 mM Tris base, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) supplemented with protease inhibitor (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma, France). Samples were then incubated on ice for 10 min followed by centrifugation at 11 000 x g at 4°C. The supernatant containing protein extracts was collected and the protein concentration determined using the BCA Protein Assay Reagent Kit (Life Technologies).

2.4. Electrophoresis assay and western blotting

Protein extracts were diluted in water, loading buffer (ThermoFisher Scientific, Pierce) as well as NuPAGE 10X reducing and denaturing agent containing 500 mM dithiothreitol (DTT) (Thermo Scientific, Pierce). Proteins were separated on a 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gel (Bio-Rad, France). The transfer was carried out under semi-dry conditions (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad, France) using a PVDF membrane. The proteins of interest were detected by overnight incubation with the primary specific antibodies; anti-ALCAT1 (abcam 153987, Germany) and anti-TAZ ([22]) at 4°C under shaking condition. The next day the membranes were washed twice with TBS 0,1% Tween and then incubated with secondary antibody (Santa Cruz BioTechnology) for 1 h at room temperature. Finally, the membranes are washed three times for 5 min with TBS 0.1% Tween and bands were revealed using the Pierce ECL kit (ThermoFisher Scientific). β -actin served as loading control (β -actin-HRP Santa Cruz). The images were taken using ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, France) and the bands intensity were quantified by Image J software.

2.5. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

CL fatty acid molecular species analysis was carried out using LCMS/MS. Lipids were extracted from cell pellets (7-10 million) according to the method of Folch et al. [23]. In brief, cells were spiked with (14:0)4-CL used as internal standard (250 ng, Avanti Polar Lipids, Coger, Paris, France). Lipids were extracted with 1ml of saline and 3.5ml of CHCl₃:MeOH (2:1 by vol.) for 10 min followed by the addition of 1.25 ml CHCl₃ for 10 min and finally 1.25 ml of distilled water for 5 min. The organic phase was collected and dried under vacuum. Lipid extracts were further solubilized in 100 μ l of CHCl₃:MeOH:H₂O (60:30:4.5, by vol). LCMS/MS analyses were performed with a 1260 series HPLC system coupled to a 6460 triple quadrupole mass spectrometer equipped with a JetStream electrospray ionization source (Agilent Technologies). HPLC separation was achieved with a Zorbax EclipsePlus C18 —2.1mmx 100mm, 1.8 μ m column (Agilent Technologies) maintained at 50°C. The mobile phases

consisted of ACN, water, 28% NH₃ in water and acetic acid (90:10:0.2:0.5, by vol) (A) and of IPA, water, 28% NH₃ in water and acetic acid (90:10:0.2 :0.5, by vol) (B). The linear gradient was as follows: 50% B for 5 min, up to 80% B for 10 min, up to 100% for 15 min and maintained at 100% for 5 min. Column was equilibrated with 50% B for 5 min before each injection. The flow rate was set up at 0.4 ml/min. Four microliters were injected onto the LCMS/MS system. Analyses were performed in negative ion mode by selected reaction monitoring (SRM) as previously described [24].

2.6. High performance thin layer chromatography

CL content was measured by HPTLC-densitometry as described [25]. From a pellet of 15 million cells, lipids were extracted following the protocol of Bligh and Dyer [26]. Lipid extracts were then separated by High-Performance Thin-Layer Chromatography-densitometry as previously described [24]. In order to quantify CL and MLCL, standards and samples were loaded on silica plates using Automatic TLC Sampler 4 (ATS4, CAMAG, Muttentz 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 visualize phospholipids. Quantification was performed using Thin-Layer Chromatography Visualizer 1® and WinCats VideoScan® software (CAMAG, Muttentz, Switzerland).

2.7. Cell viability assay

Cell viability in response to DOX treatment was carried out following 72 h treatment with 25 nM of DOX. Culture medium was renewed every day. Cell viability was assessed using the sulforhodamine B (SRB) test. It indirectly measures cell growth by forming a colorimetric complex (540 nm) whose intensity is proportional to the number of cells present. The cells were seeded in a 24-well plate (bdBioSciences) at a density of 30 000 cells/well in 0.5 ml of culture medium. The culture medium containing or not containing the treatments was removed from the wells and the cells were washed twice with PBS containing calcium and magnesium (Lonza, France). The cells were then fixed with 50% TCA (Trichloroacetic Acid, Sigma-Aldrich, France) and then incubated for 1 h at 4°C. 200 µL of SRB (Sigma Aldrich, France) at 0.4% (diluted in 1% acetic acid) was added to the cells for 15 min under shaking conditions at room temperature. SRB solution was removed with 1% acetic acid and then the cells were lysed with 10 mM Tris Base (ThermoFisher, France). The absorbance of each well was read at 540 nm.

2.8. Glycolytic and mitochondrial energy metabolism assay

The study of mitochondrial energy metabolism was carried out in collaboration with the team of Prof. Olivier Herault at the CHRU de Tours (Biological Hematology Department) using the Seahorse™ extracellular flow analyzer (XF96) (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA) as described [27]. This technique allows real-time measurement of oxygen consumption

rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) of living cells in a microplate in response to different substrates or inhibitors. The data are normalized on the amount of DNA and expressed in pmoles / min / ngDNA (OCR) and mpH / min / ngDNA (ECAR).

2.9. Preparation of isolated mitochondria

All steps were performed at 4°C to prevent degradation. Cells were detached using trypsin (Eurobio, France) and cell membranes permeabilized by exposure to digitonin (6 µg per $\times 10^6$ cells for MCF-7 and 8 µg per $\times 10^6$ cells for MCF-7dox). 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 supernatant was recovered and the pellet was resuspended in isolation buffer and centrifuged at 1 000 x g for 10 min. The supernatant was recovered and mixed with the first supernatant. The resulting supernatant 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 Protein Assay Reagent Kit (Life Technologies).

2.10. Assembly of mitochondrial respiratory chain supercomplexes

Complex I assembly was analyzed by Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis (BN Page) according to [28]. Briefly, mitochondria were isolated from cells pellets by differential centrifugation (10 000 x g, 10 min, 4°C) after digitonin permeabilization. Mitochondrial complexes were solubilized in Laurylmaltoside (3g/g of protein) and 50 µg of protein was loaded and resolved in a native 4-16% acrylamide gel. Proteins were transferred to PVDF membrane in a dry transfer apparatus (Bio-Rad, France). Membranes were immunoblotted with antibodies raised against NDUFB6 and NDUFS2 for complex 1, SDHA for complex 2 (used as loading reference), III core 2 for complex 3 and COX Va for complex 4 (1/1000e, Abcam, Germany) and bands were visualized by chemiluminescence on an Odyssey apparatus (Li-Cor Biosciences). For supercomplexes detection, the same protocol was applied except larylmatoside solubilization was replaced with digitonin (3g/g of proteins).

2.11. Cardiolipin metabolism enzymatic activities

Phosphatidylglycerol phosphate synthase (PGPS) enzyme activity was determined as described [29]. CL synthase (CLS) activity was assayed as described [30], with the following modifications : 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 conducted at 37°C for 60 min with [¹⁴C]PG (specific radioactivity 45000 dpm/nmol). Monolysocardiolipin acyltransferase-1 (MLCL AT-1) activity was determined as described [31]. Phospholipase A₂ (PLA₂) activity was measured as described [32].

2.12. Statistical analysis

Results were expressed as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed using graphPad Prism. Significance between groups was determined by Mann-Whitney test for two groups and Kruskal-Wallis for multiple comparisons. $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. CL metabolism is reprogrammed in DOX-resistant breast cancer cells

Quantification of CL by LCMS/MS demonstrated a 30% decrease in CL content in DOX resistant cells (MCF-7dox) compared to the sensitive cells (MCF-7) (Fig. 1A). In addition, the proportion of identified molecular CL species was different between the sensitive and resistant cell lines (Fig. 1B). For instance, in MCF-7 cells, CL was predominantly composed of palmitoleic acid (16: 1). In contrast, the quantity of CL mainly possessing oleic acid (18: 1) and linoleic acid (18: 2) was significantly increased in MCF-7dox cells (Fig. 1C). HPTLC analysis confirmed that the quantity of CL was decreased in MCF-7dox cells compared to MCF-7 cells (Fig. 1D). However, the quantity of MLCL was increased in MCF-7dox cells compared to MCF-7 cells suggesting a problem in remodeling and maturation of CL. Taken together, these results show a drastic change in CL metabolism in the MCF-7dox DOX-resistant breast cancer cell model.

3.2. Reprogramming of CL metabolism is associated with alteration of CLS activity and TAZ content in DOX resistant breast cancer cells

We further studied the activities of the CL metabolism enzymes, CLS, phosphatidylglycerol phosphate synthase (PGPS), phospholipase A₂ (PLA₂) and MLCLAT1 and the content of TAZ in these cells. There were no differences in the activities of PGPS, PLA₂ and MCLAT1 in MCF-7dox cells compared to MCF-7 cells (Fig. 2A- 2C). However, we observed a decrease in activity of CLS (Fig. 2D) and a decrease in the protein level of the CL remodeling enzyme TAZ in MCF-7dox cells compared to MCF-7 cells (Fig. 2E). TAZ transfers fatty acid chains to MLCL to form mature and functional CL [33], [34]. This process modifies the CL profile depending on the availability of fatty acyl chains in the environment and can be manipulated by lipid supplementation [35]. In order to evaluate the functioning of TAZ in MCF-7dox cells, we studied transfer of fatty acids into CL by adding palmitic acid (PA) (16:0) and linoleic acid (LA) (18:2) to the culture medium followed by incubation for 72 h. We observed that enrichment of medium by PA and LA significantly increased the quantity of CL in MCF-7 cells (Fig. 2F). This was associated with a significant increase in CL species that are mainly composed of LA and palmitoleic acid (16: 1) (Fig. 2G). In contrast, in MCF-7dox cells, neither the quantity nor composition of CL were changed following treatment with PA and LA

(Fig. 2F and 2G). Collectively, our results show that CLS and TAZ activities are altered in MCF-7dox cells and suggest that the reprogramming of CL metabolism in MCF-7 DOX-resistant breast cancer cells is due to dysfunction of CLS and TAZ.

3.3. TAZ deficiency alters CL metabolism in MCF-7 breast cancer cells

In order to study in a more detailed way the role of CL remodeling enzymes in CL metabolism in MCF-7 cells, TAZ and ALCAT1 deficient MCF-7 cells were generated. Deletion of TAZ in MCF-7 cells (TAZ-deficient) decreased the amount of CL by 30% compared to wild type MCF-7 cells (Fig. 3A) and increased the MLCL/CL ratio by 2,5 times ($0,6 \pm 0,05$ in MCF-7 vs $1,6 \pm 0,4$ in TAZ-deficient MCF-7) while MLCL content was not changed ($0,2 \pm 0,01$ in MCF-7 vs $0,2 \pm 0,03$ in TAZ-deficient MCF-7) (Fig.3B). This was associated with a modification of the CL acyl chain composition (Fig. 3C). For instance, molecular CL species containing palmitic acid (16:0) (68:2) was increased (Fig. 3D) whereas the amount of 68:4, 68:5, 70:4 and 70:5 i.e., CL with unsaturated fatty acyl (16:1 and 18:1 and 18:2) were decreased (Fig. 3E and 3F). Interestingly, the proportion of molecular CL species containing mainly four monounsaturated fatty acids in its acyl chain (70:4) was not changed following the deletion of TAZ (Fig. 3C). In contrast, ALCAT1 deficiency does not alter CL metabolism since CL content and molecular CL species content was not different between MCF-7 WT and MCF-7 ALCAT1-deficient cells even though the levels of ALCAT1 protein were significantly decreased in these cells (Fig. 3G and 3H). Collectively, these data confirm the importance of TAZ in the CL remodeling process and show that alteration of TAZ is sufficient to alter CL metabolism in MCF-7 breast cancer cells.

3.4. TAZ deficiency decreases chemosensitivity of MCF-7 breast cancer cells to DOX

We next studied the effects of TAZ deletion on the viability of MCF-7 cells in response to 72 h of treatment with DOX. Our results show that the viability of TAZ-deficient cells in response to DOX was increased by 40% compared to the control condition (Fig. 4A). Thus, TAZ deletion decreases the chemosensitivity of MCF-7 breast cancer cells to DOX. Interestingly, TAZ deletion does not affect the cell viability of TAZ-deficient cells when compared with MCF-7 WT (Fig. 4B).

3.5. TAZ deficiency does not affect mitochondrial energy metabolism in MCF-7 breast cancer cells

We examined the effect of TAZ deficiency on mitochondrial energy metabolism in MCF-7 cells. Deletion of TAZ in MCF-7 cells (TAZ-deficient) did not affect mitochondrial oxygen consumption in basal condition, linked to maximal respiratory chain activity, linked to energy wasting and dedicated to ATP production compared to wild type (WT) cells (Fig. 4C). In addition, deletion of TAZ had no effect on glycolytic metabolism since glycolysis, glycolytic

capacity and glycolytic reserve did not differ between TAZ-deficient and WT cells (Fig. 4D). Moreover, total ATP production was not altered by TAZ deficiency in MCF-7 cells (Fig. 4E). In addition, the assembly of mitochondrial complexes and the quantity of the mitochondrial supercomplexes of the respiratory chain were not altered in TAZ-deficient cells compared to WT cells (Figs. 4F). Thus, TAZ deficiency does not affect mitochondrial energy metabolism in MCF-7 breast cancer cells.

4. Discussion

The aim of the present study was to investigate the biological role played by CL metabolism, with a special attention to the CL remodeling enzyme TAZ, in breast cancer cells in the context of DOX resistance. We found that the protein level of TAZ was decreased in MCF-7dox cells and that this was accompanied by a reduction in CL, alteration in CL molecular species composition, accumulation of MLCL and reduced incorporation of palmitate and linoleate into CL. In addition, deletion of TAZ, in wild type MCF-7 DOX sensitive cells, and the ensuing decrease in CL content and changes in CL composition, decreased sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to DOX and increased cellular viability in response to DOX treatment. It has been previously demonstrated that CL metabolism is reprogrammed in cancer [36]–[39]. However, to our knowledge, our data are the first to show a direct impact of modulation of CL metabolism and/or TAZ on DOX resistance in MCF-7 breast cancer cells.

CL is a lipid dimer comprised of two phosphatidyl groups linked by a glycerol. Thus, CL has four acyl chains attached, distinguishing it from typical phospholipids which have two acyl chains. The final composition of the acyl chain of CL is not defined during its biosynthesis, but during remodeling steps [40], [41]. These remodeling mechanisms generate a final molecular form of CL that is homogeneous with respect to its acyl chain composition, exhibits symmetry between the two chiral centers of CL, and is cell type and tissue specific [42], [43]. That is why, the final molecular form of CL is not the same in different organisms or even in different tissues within the same organism, suggesting that the different molecular forms of CL observed in different cells and tissues are adapted to respond the functional requirements and/or energy demands of this cell/tissue [34], [44]. CL is essential for many mitochondrial bioenergetic processes [40], [45], [46]. It is now well accepted that mitochondria are involved in key steps of cancer aggressiveness such as chemoresistance. In the present study, we found that the TAZ-mediated alterations in CL content and composition had no effect on mitochondrial energy metabolism. Indeed, mitochondrial oxygen consumption, assembly of the complexes and the quantity of the supercomplexes of the oxidative phosphorylation system were not different between MCF-7 WT and MCF-7 TAZ-deficient cells. This therefore

excludes the involvement mitochondrial energy metabolism in the TAZ deficiency-mediated decrease in DOX sensitivity of MCF-7 cells. Interestingly, it was recently demonstrated that expression of the complexes of oxidative phosphorylation may be responsible for inducing CL remodeling [42]. In fact, Xu and colleagues showed that knockdown of oxidative phosphorylation complexes had a similar effect on CL as the knockdown of TAZ, including a change in the composition of CL and accumulation of MLCL [42]. CL is also known to have a high affinity for the chemotherapeutic agent DOX, resulting in a lower mitochondrial accumulation of the drug in cells with a reduced CL content [47]. It is possible that the TAZ deficiency-mediated decrease in DOX sensitivity of MCF-7 cells could be explained by a reduced accumulation of the drug in mitochondria.

Another important result of the present study is the key role played by TAZ in CL metabolism of MCF-7 breast cancer cells. Interestingly, only the deletion of TAZ, but not ALCAT1, lead to a substantial change in the content and composition of CL in MCF-7 highlighting the importance of TAZ in CL metabolism in these breast cancer cells. This difference might be related to the fact that TAZ catalyzes the remodeling of CL in a single step, in which the acyl groups are exchanged between the phospholipid and the lysophospholipid [33]. In this process, phospholipases are not required to generate MLCL since the transacylation reaction between lysophospholipid and CL can directly generate phospholipid and MLCL. The subsequent transacylation between MLCL and an adjacent phospholipid generates a remodeled CL [33]. Our data revealed that TAZ deficiency increases the incorporation of palmitic acid (16: 0) in CL and that CL containing unsaturated fatty acyl (16: 1, 18: 1 and 18: 2) were lower in TAZ-deficient MCF-7 breast cancer cells. This “immature CL composition” was similar to the molecular CL species composition observed in MCF-7dox cells and has also been observed in other cancer cells [2], [48]. Interestingly, we found that the distribution of fatty acids incorporated into CL and the CL content were drastically modified in response to fatty acid supplementation only in MCF-7 but not in MCF-7dox cells where TAZ was deficient. Collectively these data suggest that TAZ controls the specific CL composition of MCF-7dox cells and contributes to DOX resistance.

In summary, CL content is decreased, CL composition modified and TAZ content and activity are altered in DOX-resistant MCF-7 breast cancer cells. Secondly, among the two CL remodeling enzymes: ALCAT1 and TAZ, only deletion of TAZ leads to a substantial change in the content and composition of CL in MCF-7 cells resulting in an “immature CL composition”. Finally, deletion of TAZ decreases DOX sensitivity in MCF-7 breast cancer cells. In conclusion, our data highlight the important role of the CL remodeling enzyme TAZ in regulating DOX resistance in MCF-7 breast cancer cells. Whether changes in the amount or

composition of CL or both are involved in the development of DOX resistance in MCF-7 cells remain to be investigated.

Funding: This work was partly supported by the “Ligue Nationale Contre le Cancer” (comités 28, 37, 41, 53, 85), by the “Canceropole Grand Ouest” (CONCERTO, régions Centre-Val de Loire, Pays de Loire et Bretagne) and by the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer” and the Heart and Stroke Foundation of Canada. S.T.A. was supported by “Université de Tours”. G.M.H. is the Canada Research Chair in Molecular Cardiolipin Metabolism.

Author contributions:

Seyedeh Tayebbeh Ahmadpour : Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing-original draft preparation, Writing-review and editing. **Michelle Pinault :** Methodology, Formal analysis. **Cyrille Guimaraes :** Methodology, Formal analysis. **Valérie Desquirit-Dumas :** Methodology, Formal analysis, Validation. **Julie Dartier :** Methodology. **Isabelle Domingo :** Methodology. **Jérôme Bourgeais :** Methodology, Formal analysis. **Jean-Paul Pais de Barros :** Methodology, Formal analysis. **Charlotte Orre :** Methodology. **Naïg Gueguen :** Methodology, Formal analysis. **Olivier Hérault :** Validation. **Laurent Maillet :** Methodology, Formal analysis, Validation, Writing-review and editing. **Sophie Barillé-Nion :** Methodology, Formal analysis. **Steven Claypool :** Validation, Writing-review and editing. **Grant M. Hatch :** Validation, Writing-review and editing. **Karine Mahéo :** Validation, Writing-review and editing. **Jean-François Dumas :** Conceptualization, Validation, Writing-review and editing, Funding acquisition. **All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.**

Data Availability Statement: The data is presented in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] C. T. Chu *et al.*, 'Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells', *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 10, pp. 1197–1205, Oct. 2013, doi: 10.1038/ncb2837.
- [2] H. Zhong *et al.*, 'Mitochondrial control of apoptosis through modulation of cardiolipin oxidation in hepatocellular carcinoma: A novel link between oxidative stress and cancer', *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 102, pp. 67–76, 2017, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.494.
- [3] Y. Tamura *et al.*, 'TAM41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria', *Cell Metab.*, vol. 17, no. 5, pp. 709–718, May 2013, doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.018.
- [4] J. Zhang *et al.*, 'Mitochondrial phosphatase PTPMT1 is essential for cardiolipin biosynthesis', *Cell Metab.*, vol. 13, no. 6, pp. 690–700, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.cmet.2011.04.007.
- [5] D. Chen, X.-Y. Zhang, and Y. Shi, 'Identification and functional characterization of hCLS1, a human cardiolipin synthase localized in mitochondria', *Biochem. J.*, vol. 398, no. 2, pp. 169–176, Sep. 2006, doi: 10.1042/BJ20060303.
- [6] M. Schlame, M. Ren, Y. Xu, M. L. Greenberg, and I. Haller, 'Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins', *Chem. Phys. Lipids*, vol. 138, no. 1–2, pp. 38–49, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2005.08.002.
- [7] M. Schlame and M. Ren, 'Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism', *FEBS Lett.*, vol. 580, no. 23, pp. 5450–5455, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.febslet.2006.07.022.
- [8] S. M. Claypool, 'Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function', *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1788, no. 10, pp. 2059–2068, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.bbamem.2009.04.020.
- [9] M. Schlame and Y. Xu, 'The Function of Tafazzin, a Mitochondrial Phospholipid-Lysophospholipid Acyltransferase', *J. Mol. Biol.*, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.jmb.2020.03.026.
- [10] S. Bione, P. D'Adamo, E. Maestrini, A. K. Gedeon, P. A. Bolhuis, and D. Toniolo, 'A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth syndrome', *Nat. Genet.*, vol. 12, no. 4, pp. 385–389, Apr. 1996, doi: 10.1038/ng0496-385.
- [11] S. Chen, Q. He, and M. L. Greenberg, 'Loss of tafazzin in yeast leads to increased oxidative stress during respiratory growth', *Mol. Microbiol.*, vol. 68, no. 4, pp. 1061–1072, May 2008, doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06216.x.

- [12] L. Schild *et al.*, ‘Proliferation of C6 glioma cells requires the phospholipid remodeling enzyme tafazzin independent of cardiolipin composition’, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1865, no. 3, p. 158596, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.bbalip.2019.158596.
- [13] Y.-W. Lu and S. M. Claypool, ‘Disorders of phospholipid metabolism: an emerging class of mitochondrial disease due to defects in nuclear genes’, *Front. Genet.*, vol. 6, p. 3, 2015, doi: 10.3389/fgene.2015.00003.
- [14] W. A. Taylor and G. M. Hatch, ‘Purification and characterization of monolysocardiolipin acyltransferase from pig liver mitochondria’, *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 15, pp. 12716–12721, Apr. 2003, doi: 10.1074/jbc.M210329200.
- [15] S. T. Ahmadpour, K. Mahéo, S. Servais, L. Brisson, and J.-F. Dumas, ‘Cardiolipin, the Mitochondrial Signature Lipid: Implication in Cancer’, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 21, Oct. 2020, doi: 10.3390/ijms21218031.
- [16] H.-M. Feng *et al.*, ‘Expression and potential mechanism of metabolism-related genes and CRLS1 in non-small cell lung cancer’, *Oncol. Lett.*, vol. 15, no. 2, pp. 2661–2668, Feb. 2018, doi: 10.3892/ol.2017.7591.
- [17] J. Yin, Q. Liu, C. Chen, and W. Liu, ‘Small regulatory polypeptide of amino acid response negatively relates to poor prognosis and controls hepatocellular carcinoma progression via regulating microRNA-5581-3p/human cardiolipin synthase 1’, *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, no. 10, pp. 17589–17599, 2019, doi: 10.1002/jcp.28383.
- [18] S. Pathak *et al.*, ‘Tafazzin protein expression is associated with tumorigenesis and radiation response in rectal cancer: a study of Swedish clinical trial on preoperative radiotherapy’, *PloS One*, vol. 9, no. 5, p. e98317, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0098317.
- [19] M. Chen, Y. Zhang, and P.-S. Zheng, ‘Tafazzin (TAZ) promotes the tumorigenicity of cervical cancer cells and inhibits apoptosis’, *PloS One*, vol. 12, no. 5, p. e0177171, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0177171.
- [20] A. K. Seneviratne *et al.*, ‘The Mitochondrial Transacylase, Tafazzin, Regulates for AML Stemness by Modulating Intracellular Levels of Phospholipids’, *Cell Stem Cell*, vol. 24, no. 4, pp. 621–636.e16, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.stem.2019.02.020.
- [21] N. E. Sanjana, O. Shalem, and F. Zhang, ‘Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening’, *Nat. Methods*, vol. 11, no. 8, pp. 783–784, Aug. 2014, doi: 10.1038/nmeth.3047.

- [22] Y.-W. Lu *et al.*, ‘Defining functional classes of Barth syndrome mutation in humans’, *Hum. Mol. Genet.*, vol. 25, no. 9, pp. 1754–1770, May 2016, doi: 10.1093/hmg/ddw046.
- [23] J. Folch, M. Lees, and G. H. Sloane Stanley, ‘A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues’, *J. Biol. Chem.*, vol. 226, no. 1, pp. 497–509, May 1957.
- [24] L. Peyta *et al.*, ‘Regulation of hepatic cardiolipin metabolism by TNF α : Implication in cancer cachexia’, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1851, no. 11, pp. 1490–1500, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.bbalip.2015.08.008.
- [25] M. Pinault *et al.*, ‘A 1D High Performance Thin Layer Chromatography Method Validated to Quantify Phospholipids Including Cardiolipin and Monolysocardiolipin from Biological Samples’, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 122, no. 2, p. 1900240, 2020, doi: 10.1002/ejlt.201900240.
- [26] E. G. Bligh and W. J. Dyer, ‘A rapid method of total lipid extraction and purification’, *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 37, no. 8, pp. 911–917, Aug. 1959, doi: 10.1139/o59-099.
- [27] J. Bourgeais and O. Hérault, ‘In Vitro Analysis of Energy Metabolism in Bone-Marrow Mesenchymal Stromal Cells’, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 2308, pp. 59–70, 2021, doi: 10.1007/978-1-0716-1425-9_5.
- [28] G. Leman *et al.*, ‘Assembly defects induce oxidative stress in inherited mitochondrial complex I deficiency’, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 65, pp. 91–103, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.biocel.2015.05.017.
- [29] G. M. Hatch and G. McClarty, ‘Regulation of cardiolipin biosynthesis in H9c2 cardiac myoblasts by cytidine 5’-triphosphate’, *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 42, pp. 25810–25816, Oct. 1996, doi: 10.1074/jbc.271.42.25810.
- [30] M. Schlame and K. Y. Hostetler, ‘Mammalian cardiolipin biosynthesis’, *Methods Enzymol.*, vol. 209, pp. 330–337, 1992, doi: 10.1016/0076-6879(92)09041-z.
- [31] W. A. Taylor and G. M. Hatch, ‘Identification of the human mitochondrial linoleoyl-coenzyme A monolysocardiolipin acyltransferase (MLCL AT-1)’, *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 44, pp. 30360–30371, Oct. 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.048322.
- [32] Y. J. Jiang *et al.*, ‘Stimulation of cardiac cardiolipin biosynthesis by PPAR α activation’, *J. Lipid Res.*, vol. 45, no. 2, pp. 244–252, Feb. 2004, doi: 10.1194/jlr.M300314-JLR200.
- [33] C. Ye, Z. Shen, and M. L. Greenberg, ‘Cardiolipin remodeling: a regulatory hub for modulating cardiolipin metabolism and function’, *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 48, no. 2, pp. 113–123, Apr. 2016, doi: 10.1007/s10863-014-9591-7.

- [34] Y. Xu, A. Malhotra, M. Ren, and M. Schlame, ‘The enzymatic function of tafazzin’, *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 51, pp. 39217–39224, Dec. 2006, doi: 10.1074/jbc.M606100200.
- [35] H.-C. Ting, Y.-J. Chao, and Y.-H. H. Hsu, ‘Polyunsaturated fatty acids incorporation into cardiolipin in H9c2 cardiac myoblast’, *J. Nutr. Biochem.*, vol. 26, no. 7, pp. 769–775, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.02.005.
- [36] E. C. Randall *et al.*, ‘Molecular Characterization of Prostate Cancer with Associated Gleason Score Using Mass Spectrometry Imaging’, *Mol. Cancer Res. MCR*, vol. 17, no. 5, pp. 1155–1165, 2019, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-1057.
- [37] M. Terao *et al.*, ‘Role of mitochondria and cardiolipins in growth inhibition of breast cancer cells by retinoic acid’, *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR*, vol. 38, no. 1, p. 436, Oct. 2019, doi: 10.1186/s13046-019-1438-y.
- [38] J. Zhang *et al.*, ‘Cardiolipins Are Biomarkers of Mitochondria-Rich Thyroid Oncocytic Tumors’, *Cancer Res.*, vol. 76, no. 22, pp. 6588–6597, 15 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1545.
- [39] A. Sapandowski *et al.*, ‘Cardiolipin composition correlates with prostate cancer cell proliferation’, *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 410, no. 1–2, pp. 175–185, Dec. 2015, doi: 10.1007/s11010-015-2549-1.
- [40] M. Ren, C. K. L. Phoon, and M. Schlame, ‘Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin’, *Prog. Lipid Res.*, vol. 55, pp. 1–16, Jul. 2014, doi: 10.1016/j.plipres.2014.04.001.
- [41] M. Schlame *et al.*, ‘The physical state of lipid substrates provides transacylation specificity for tafazzin’, *Nat. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 10, pp. 862–869, Oct. 2012, doi: 10.1038/nchembio.1064.
- [42] Y. Xu *et al.*, ‘Assembly of the complexes of oxidative phosphorylation triggers the remodeling of cardiolipin’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 23, pp. 11235–11240, Jun. 2019, doi: 10.1073/pnas.1900890116.
- [43] F. M. Vaz, R. H. Houtkooper, F. Valianpour, P. G. Barth, and R. J. A. Wanders, ‘Only one splice variant of the human TAZ gene encodes a functional protein with a role in cardiolipin metabolism’, *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 44, pp. 43089–43094, Oct. 2003, doi: 10.1074/jbc.M305956200.
- [44] Z. Gu *et al.*, ‘Aberrant cardiolipin metabolism in the yeast taz1 mutant: a model for Barth syndrome’, *Mol. Microbiol.*, vol. 51, no. 1, pp. 149–158, Jan. 2004, doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03802.x.

- [45] A. Musatov and E. Sedlák, 'Role of cardiolipin in stability of integral membrane proteins', *Biochimie*, vol. 142, pp. 102–111, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.biochi.2017.08.013.
- [46] N. Ikon and R. O. Ryan, 'Cardiolipin and mitochondrial cristae organization', *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, vol. 1859, no. 6, pp. 1156–1163, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.bbamem.2017.03.013.
- [47] B. Aryal and V. A. Rao, 'Deficiency in Cardiolipin Reduces Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in Human B-Lymphocytes', *PloS One*, vol. 11, no. 7, p. e0158376, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0158376.
- [48] S. Gürtler *et al.*, 'Tafazzin-dependent cardiolipin composition in C6 glioma cells correlates with changes in mitochondrial and cellular functions, and cellular proliferation', *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1864, no. 4, pp. 452–465, 2019, doi: 10.1016/j.bbalip.2019.01.006.

Titles and legends to figures

Figure 1: CL metabolism is altered in DOX-resistant breast cancer cells.

(A) Quantification of CL by LCMS/MS. (B) Histograms showing the proportion of fatty acids constituting acyl chains of CL. The meaning of the CL compositions represented on the histograms is as follow: 64: 4 (acyl chain is composed of four 16: 1), 66: 5 (acyl chain is composed of three 16: 1 and one 18: 2), 68: 3 (acyl chain is composed of 16: 1, 16: 0 and two 18: 1), 68: 5 (acyl chain is composed of two 16: 1, 18: 1, 18: 2), 68: 6 (acyl chain is composed of two 16: 1 and two 18: 2), 70: 5 (acyl chain is composed of 16: 1, two 18: 1 and one 18: 2), 70: 6 (acyl chain is composed of 16: 1, 18: 1, two 18: 1), 72: 4 (acyl chain is composed of four 18: 1), 72: 5 (acyl chain is composed of three 18: 1, one 18: 2). 16: 0; palmitic acid, 16: 1; palmitoleic acid, 18: 1; oleic acid, 18: 2; linoleic acid. (C) Comparison of three major CL compositions. (D) Quantification of CL and MLCL performed by the HPTLC technique. The data are presented as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, (n=6).

Figure 2: Reprogramming of CL metabolism is associated with the alteration of CLS activity and TAZ content in DOX resistant breast cancer cells.

Measurements were performed on isolated mitochondria from MCF-7 and MCF-7dox cells. Enzymatic activity of (A) phosphatidylglycerol phosphate synthase (PGPS) (n=5), (B) Phospholipase A₂ (PLA₂) (n=5) (C), (C) Monolysocardiolipin acyltransferase-1 (MLCL AT-1) (n=5), (D) Cardiolipin synthase (CLS) (n=5) and (E) Representative image of a Western blot and tafazzin (TAZ) protein expression (n=8). Effect of palmitic acid (PA) and linoleic acid (LA) on the quantity (F) and composition (G) of CL in MCF-7 and MCF-7dox cells studied by mass spectrometry (n=3). The meaning of the CL compositions represented on the histograms are as follow; 68: 6 (acyl chain is composed of two 16: 1 and two 18: 2), 70: 4 (acyl chain is composed of 16: 1, three 18: 1). The data are presented as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

Figure 3: Deletion of TAZ alters CL metabolism in MCF-7 breast cancer cells.

(A) Comparison of the quantity of CL (n=6). (B) Quantification of MLCL performed by the HPTLC technique (n=3). (C) Histogram showing the proportion of fatty acids constituting the side chains of CL in WT and TAZ-deficient cells. The meaning of the CL compositions shown on the histograms is as follow: 64: 4 (acyl chain is composed of four 16: 1), 68: 2 (acyl chain is composed of two 16: 0 and two 18: 1), 68: 5 (acyl chain is composed of two 16: 1, 18: 1, 18: 2), 70: 4 (acyl chain is composed of 16: 1 and three 18: 1), 70: 5 (acyl chain is composed of 16:

1, two 18: 1 and one 18: 2), 72:6 (acyl chain is composed of two 18:1 and two 18:2), 72:5 (acyl chain is composed of three 18:1 and one 18:2), 72:4 (acyl chain is composed of four 18:1), 16: 0; palmitic acid, 16: 1; palmitoleic acid, 18: 1; oleic acid, 18: 2; linoleic acid. **(D-F)** Comparison of CL compositions in MCF-7 WT and TAZ-deficient cells (n=6). **(G)** Representative image of a Western blot and quantification of the relative expression of the ALCAT1 protein. Protein expression is relative to β -actin (n=3). **(H)** Study of the quantity and composition of CL in ALCAT1-deficient cells (n=6). The data are presented as mean $\pm$ SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$.

Figure 4: TAZ deficiency decreases chemosensitivity of MCF-7 breast cancer cells to DOX.

(A and B) Study of cell viability in MCF-7 WT and TAZ-deficient cells. The viability of MCF-7 cells is measured following treatment of the cells with doxorubicin (DOX) for 72 h. **(A)** The results are normalized relative to the untreated control condition and are represented as % of cell viability (n = 5). **(B)** The results are normalized relative to WT untreated condition and are represented as % of cell viability (n = 5). **(C-E)** Study of mitochondrial energy metabolism in MCF WT and TAZ-deficient cells. **(C)** Mitochondrial oxygen consumption rate (OCR) **(D)** extracellular acidification rate (ECAR) and **(E)** total ATP production. **(F)** Mitochondrial respiratory chain complexes and supercomplexes assembly. Representative image of a BN-PAGE (Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and quantification of the relative expressions of the proteins. Protein expression is normalized against Complex II (succinate dehydrogenase) (n=6). The data are presented as mean $\pm$ SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$.

Figure 1

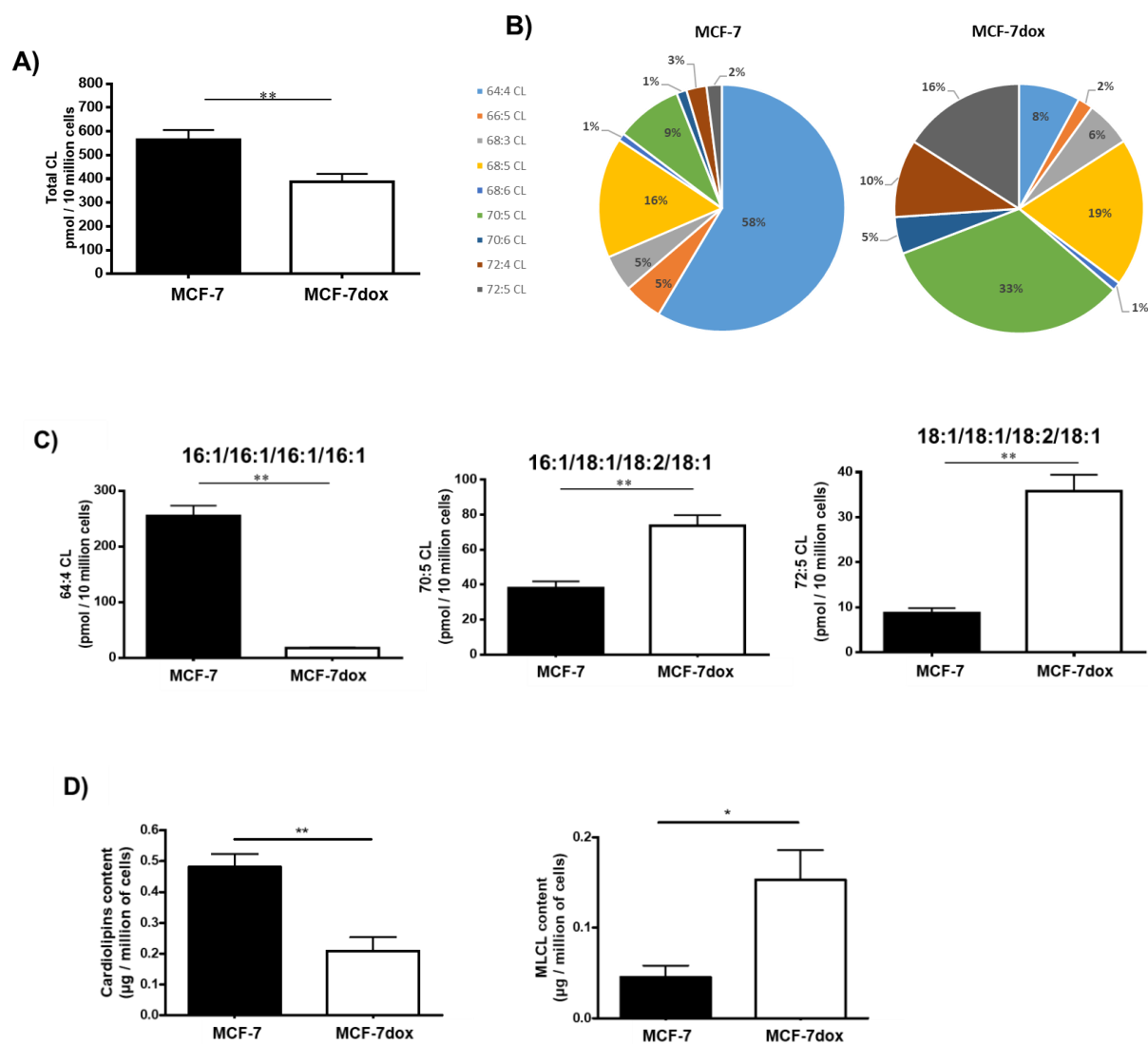


Figure 2

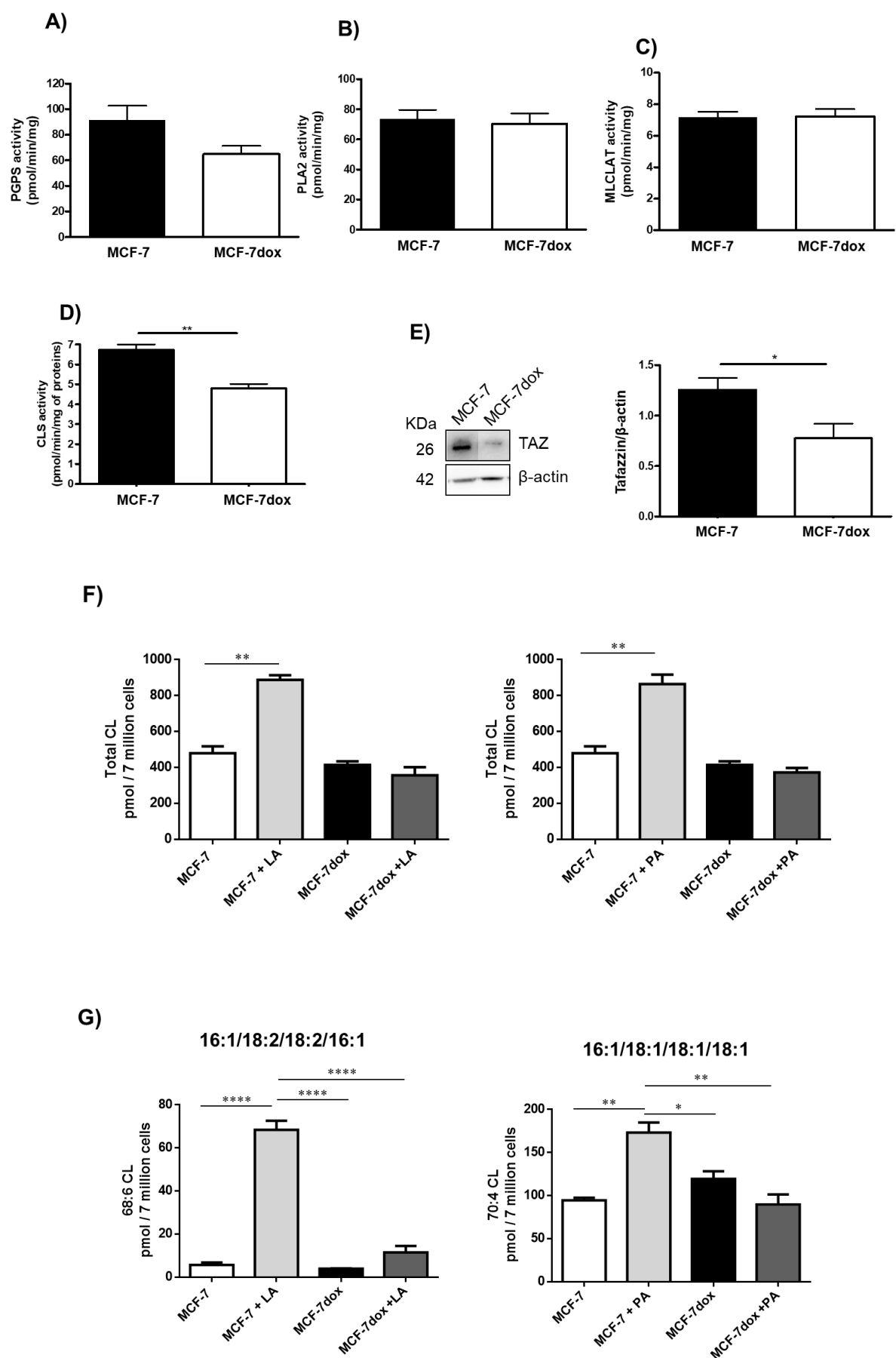
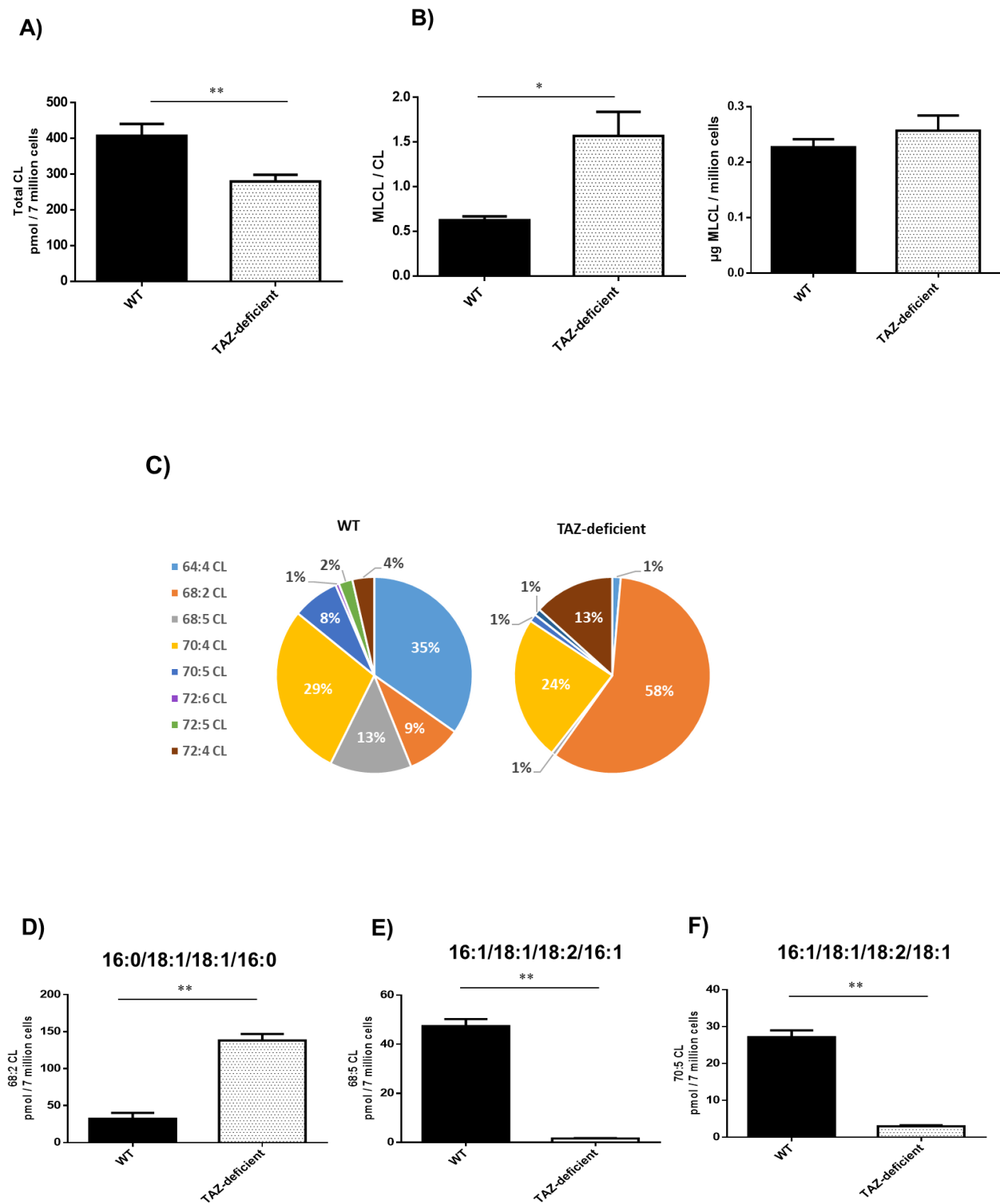
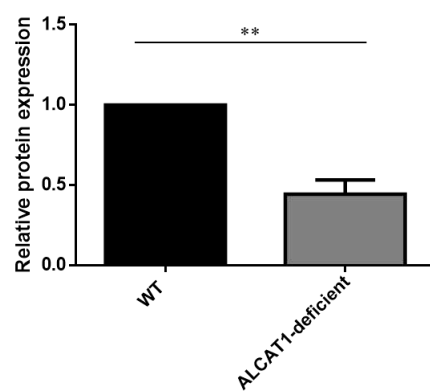
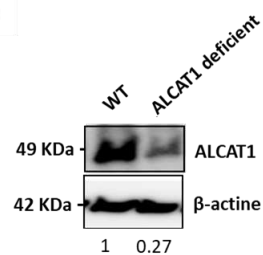


Figure 3



G)



H)

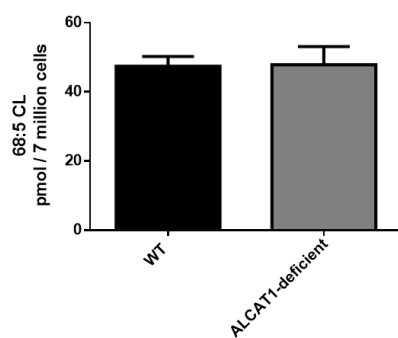
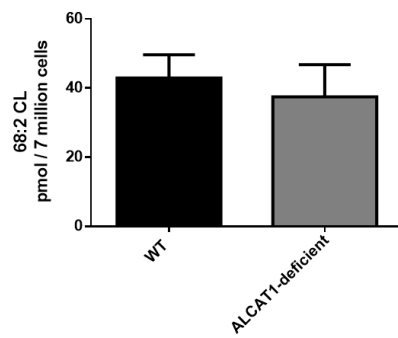
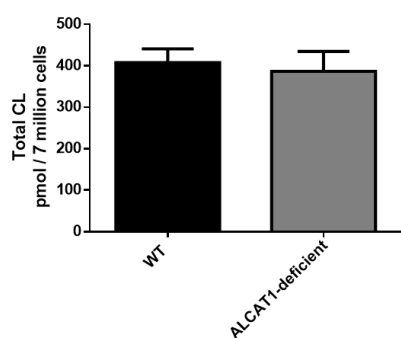
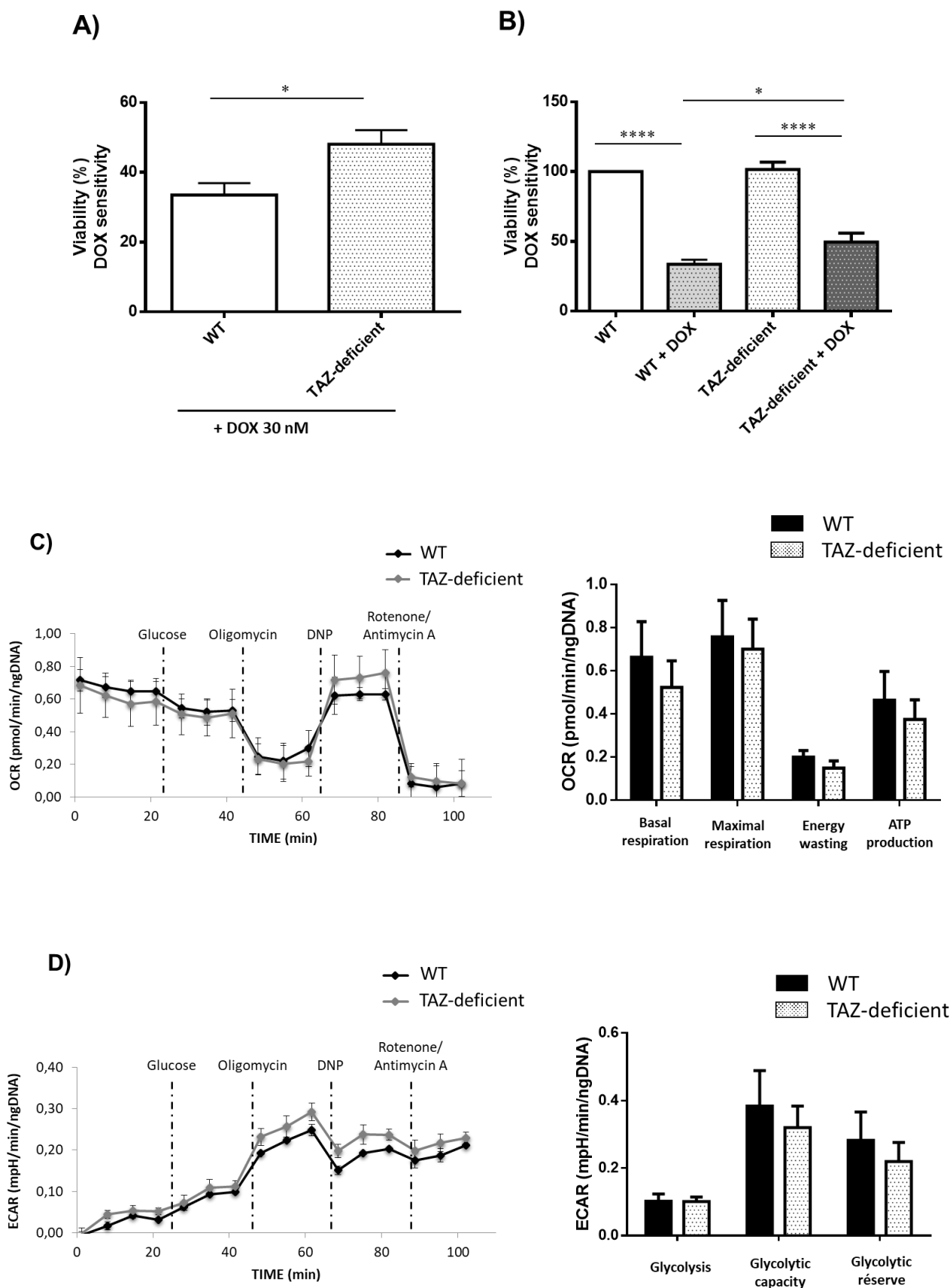
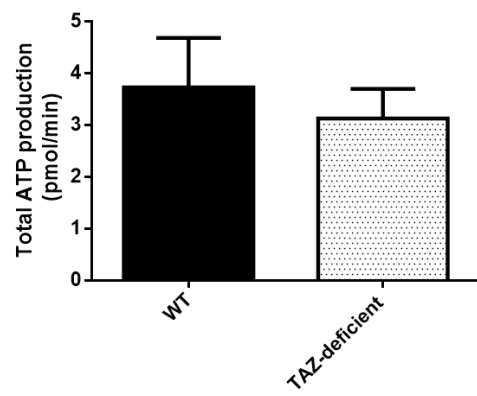


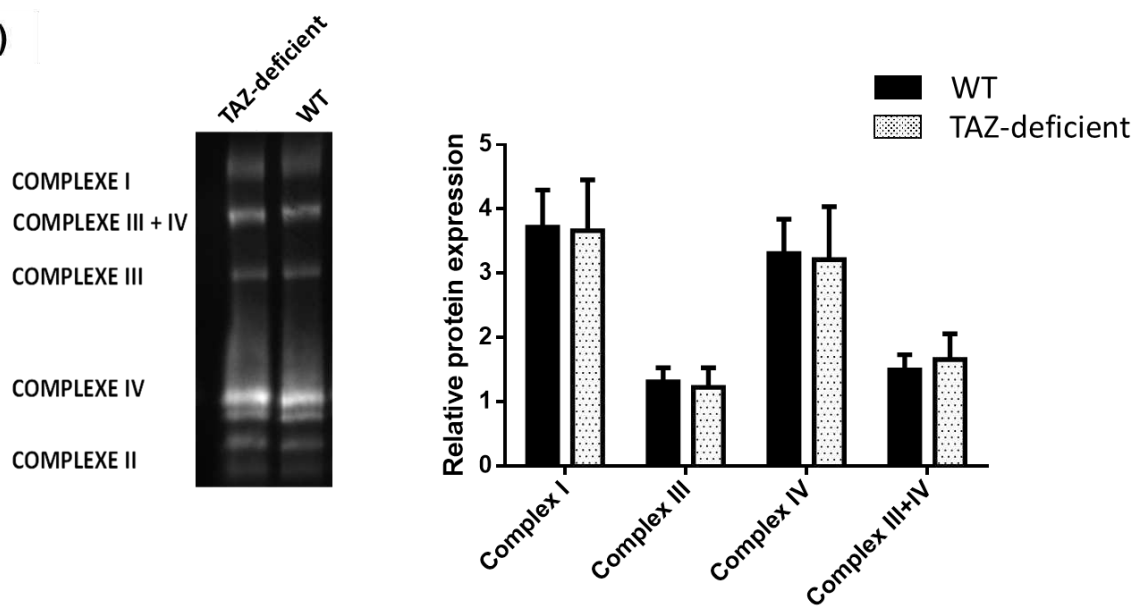
Figure 4



E)



F)



Liste des communications et publications durant la thèse

Communications

- Communication orale, réseau produit de la mer, métabolismes et cancer, Molécules Marines (2018 - Mansigné, France)
- Communication orale, 12eme journée de cancéropôle grande ouest (2018, Vannes, France)
- Poster, 13eme journée de cancéropôle grande ouest (2019, Tours, France)

Publications

Revue :

- Cardiolipin, the Mitochondrial Signature Lipid: Implication in Cancer (Seyedeh Tayebbeh Ahmad Pour et al, International Journal of Molecular Science. 2020)

Articles scientifiques :

- Doxorubicin-induced autophagolysosome formation is partly prevented by mitochondrial ROS elimination in DOX-resistant breast cancer cells (Seyedeh Tayebbeh Ahmad Pour et al, International Journal of Molecular Science. 2021)
- Cardiolipin remodeling enzyme tafazzin; potential implication in doxorubicin resistance of breast cancer cells (Seyedeh Tayebbeh Ahmad Pour et al, BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2021)- Article soumis

Seyedeh Tayebbeh AHMADPOUR

Etude du rôle de la mitophagie et de la tafazzin dans la résistance des cellules cancéreuses du sein à la doxorubicine

Résumé

La mitophagie serait un mécanisme protecteur utilisé par certaines cellules cancéreuses favorisant leur résistance aux traitements anticancéreux. Nous avons étudié le rôle de la mitophagie dans la résistance des cellules cancéreuses du sein à la doxorubicine (DOX). Nos résultats montrent que dans les cellules de cancer du sein résistantes à la DOX (MCF-7dox), la production mitochondriale de ROS et l'expression de HIF-1 alpha sont plus élevées que dans les cellules parentales (MCF-7). De plus, la DOX induit la formation d'autophagolysosomes uniquement dans les MCF-7dox et ceci semble être liée à une augmentation des ROS induite par la DOX. Les cellules résistantes MCF-7dox sont caractérisées par une modification du métabolisme des cardiolipines (CL) et une diminution de la quantité de la tafazzin (TAZ), une enzyme importante du remodelage de la CL. Nous avons observé que l'inactivation de la TAZ dans les MCF-7 entraîne une modification du métabolisme de la CL et diminue la sensibilité des cellules MCF-7 à la DOX, suggérant l'importance de la TAZ dans la résistance des cellules cancéreuses du sein à la DOX.

Mots-clés : Mitochondries, mitophagie, doxorubicine, cardiolipine, tafazzin, cancer du sein, chimiorésistance

Résumé en anglais

Mitophagy is known as a protective mechanism used by certain cancer cells to promote their resistance to anti-cancer treatments. We investigated the role of mitophagy in the resistance of breast cancer cells to doxorubicin (DOX). Our results show that in DOX-resistant breast cancer cells (MCF-7dox), mitochondrial production of ROS and expression of HIF-1 alpha are higher than in parental cells (MCF-7). In addition, DOX induces autophagolysosome formation only in MCF-7dox and this seems to be related to an increase in ROS level induced by DOX. MCF-7dox resistant cells are characterized by an alteration in cardiolipin (CL) metabolism and a decrease in the amount of tafazzin (TAZ), an important CL remodeling enzyme. We observed that TAZ deficiency in MCF-7 results in alteration of CL metabolism and decreases the sensitivity of MCF-7 cells to DOX, suggesting the importance of TAZ in resistance of breast cancer cells to the DOX.

Keywords : Mitochondria, mitophagy, doxorubicine, cardiolipin, tafazzin, breast cancer, chemoresistance