

Thesis, COLLÉGIALITÉ

Auteur : Renard, Michaël

Promoteur(s) : Struman, Ingrid

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité spécialisée en assurance qualité

Année académique : 2021-2022

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/14849>

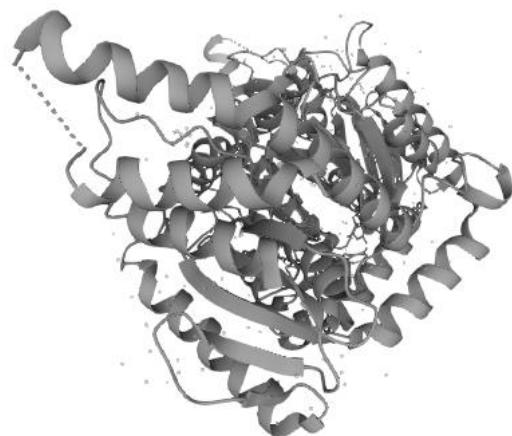
Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Michaël RENARD

Rôle de la protéine mitochondriale OPA1 dans le développement du cancer du sein et son microenvironnement



Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de :

Master en Sciences Biomédicales

Année académique 2021-2022

Promotrice : STRUMAN Ingrid

Co-Promotrice : HERKENNE Stéphanie

Remerciements

Tout d'abord, je tenais à remercier M^{me} Ingrid STRUMAN, ma promotrice, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire durant ces cinq mois.

Ensuite, j'adresse mes remerciements à M^{me} Stéphanie HERKENNE, ma co-promotrice, pour son encadrement, ses judicieux conseils, sa patience, sa disponibilité, son soutien. Elle a de plus toujours cru en moi et m'a toujours poussé vers le haut.

Par la suite, je tiens à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire d'angiogenèse moléculaire, Amandine BOECKX, Aurélie CHRISTIAN, Florian MULLER, Maureen CAMBIER, Florine HABETS, Emeline COART, Claire REMACLE ainsi que Gaëlle VANDERSTICHELEN pour leur bienveillance à mon égard, leurs disponibilités, leurs réponses à toutes mes questions ainsi que leurs conseils pour réaliser mes manipulations. Le laboratoire a de la chance de compter de telles personnes au sein de son équipe.

Je tiens à remercier Xavier COLLE, Nicolas BAWIN ainsi que Juliette BEURIOT pour le temps qu'ils ont consacré à relire ce travail.

Je souhaite également remercier mes parents qui m'ont permis de réaliser ces études et qui ont toujours été là pour moi. Leurs force et courage sont une source de motivation au quotidien.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis qui m'ont accompagné, aidé, soutenu et encouragé tout au long de la réalisation de ces cinq années d'études et de ce mémoire.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine-triphosphate

B2M : Bêta-2 microglobulin

BRCA1 et BRCA2 : Breast cancer 1 and 2

BrdU : 5-bromo-2-deoxyuridine

BSA : Bovine serum albumin

Da : Dalton

DMEM : Dulbecco's modified eagle medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DRP-1 : Dynamin-related protein

EGM-2 : Endothelial cell growth medium-2

EVs : Extracellular vesicles

ER : Récepteur à l'œstrogène

ESCRT : Endosomal sorting complexes required for transport

FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide

FBS : Fetal bovine serum

FGF : Fibroblast growth factor

FIS1 : Fission Mitochondrial 1

GED : GTPase effector domain

GTP : Guanosine triphosphate

HER2 : Human epidermal growth factor receptor 2

HUVEC : Cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical

ILVs : Intraluminal vesicles

IMM : Inner mitochondrial membrane

IMS : Intermembrane space

KO : Knock out

MC : Milieu conditionné

MFF : Mitochondria fission factor

MFN1 : Mitofusin 1

MFN2 : Mitofusin 2

MICOS : Mitochondrial contact site and cristae organizing system

MID49 et MID51 : Mitochondrial dynamics proteins 49 and 51

MVBS : Multivesicular bodies

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NOD SCID : Non-obese diabetic severe combined immunodeficiency

OMM : Outer mitochondrial membrane

OMS : Organisation mondiale de la santé

OPA1 : Optic atrophy protein 1

PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1

PBS : Phosphate-buffered saline

PFA : Paraformaldéhyde

PPIA : Peptidylprolyl isomérase A

PR : Récepteur à la progestérone

PVDF : Polyfluorure de vinylidène

ROS : Reactive oxygen species

RPM : Rotation par minute

SC : Scramble

SDS : Sodium dodecyl sulfate

siARN : small interferant RNA

TBS : Tert- butyldiméthylsilyle

TBS-T : Tert- butyldiméthylsilyle- tween

TME1L1 : Levure mitochondrial escape 1 like 1 ATPase

TNBC : Triple negative breast cancer

TOM20 : Translocase of outer mitochondrial membrane 20

UC : Ultracentrifugé

VEGF : Vascular endothelial growth factor

WT : Wild type

Résumé

Le cancer du sein est l'un des cancers les plus diagnostiqués chez la femme et reste néanmoins le cancer le plus meurtrier chez cette dernière. Le microenvironnement tumoral de cette maladie comporte une variété de types cellulaires, c'est pourquoi elle est qualifiée d'hétérogène. Les différentes cellules issues de ce microenvironnement communiquent entre elles par différents types de contacts. Parmi ceux-ci, il existe les vésicules extracellulaires qui apparaissent comme d'importants médiateurs de la communication cellule-cellule dans le microenvironnement tumoral.

À l'origine, le rôle des mitochondries dans le cancer se limitait à leur rôle apoptotique. En réalité, elles ne se contentent pas que de synthétiser la majeure partie de l'ATP, elles sont également des organites clés dans d'autres voies métaboliques. Leurs multiples fonctions cellulaires sont reflétées par leur morphologie complexe et dynamique. En effet, il existe un équilibre entre la fusion et la fission mitochondrielles. La fission mitochondriale est modulée par une protéine cytosolique, DRP-1. La fusion mitochondriale dépend quant à elle des MFN1 et 2 ainsi que de l'Atrophie Optique 1 (OPA1). OPA1 est également impliquée dans la mort cellulaire et induit de plus l'assemblage du super-complexe respiratoire qui déclenche la respiration mitochondriale et la production d'ATP. Il a été remarqué par analyses statistiques que cette protéine est surexprimée dans de nombreux cancers et que de hauts niveaux en ARNm donnaient un pronostic vital amoindri chez les femmes souffrant d'un cancer du sein.

L'objectif de ce travail va donc être de comprendre comment la protéine OPA1, dans les cellules cancéreuses du sein (MDA-MB-231), contrôle la communication avec les cellules du microenvironnement tumoral tels que les cellules endothéliales.

Abstract

Breast cancer is one of the most frequently diagnosed cancers and remains the deadliest cancer in women. The tumor microenvironment of this disease has a variety of cell types, which is why it is called heterogeneous. The different cells in this microenvironment communicate with each other through different types of contacts. Among these are extracellular vesicles, which appear as important mediators of cell-cell communication in the tumor microenvironment.

Originally, the role of mitochondria in cancer was limited to their apoptotic role. They not only synthesize most of the ATP but are also key organelles in other metabolic pathways. Their multiple cellular functions are reflected in their complex and dynamic morphology. Indeed, there is a balance between mitochondrial fusion and fission. Mitochondrial fission is modulated by a cytosolic protein, DRP-1. Mitochondrial fusion is dependent on MFN1 and MFN2 as well as on Optic Atrophy 1 (OPA1). OPA1 is also involved in cell death and induces the assembly of the respiratory supercomplex that triggers mitochondrial respiration and ATP production. It was noticed by statistical analysis that this protein is overexpressed in many cancers and that high levels of mRNA gave a poorer vital prognosis in women suffering from breast cancer.

The objective of this work is to understand how the OPA1 protein in breast cancer cells (MDA-MB-231) controls communication with cells in the tumor microenvironment such as endothelial cells.

Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1. Le cancer	1
1.1.1. Le cancer du sein	1
1.1.2. Le cancer du sein triple négatif (TNBC, <i>Triple negative breast cancer</i>).....	3
1.2. Le microenvironnement tumoral	4
1.2.1. L'angiogenèse.....	4
1.3. Les vésicules extracellulaires	5
1.3.1. Les exosomes.....	6
1.3.2. Les microvésicules	6
1.4. Les mitochondries	7
1.4.1. L'architecture des mitochondries.....	7
1.4.2. La membrane mitochondriale externe	8
1.4.3. La membrane mitochondriale interne.....	8
1.4.4. Les fonctions des mitochondries	8
1.5. La dynamique mitochondriale.....	9
1.5.1. La fission mitochondriale.....	10
1.5.2. La fusion mitochondriale	11
1.6. Optic Protein Atrophy 1 (OPA1)	13
1.6.1. Les fonctions d'OPA1.....	14
1.6.2. OPA 1 dans le cancer	15
2. Hypothèse, objectifs et stratégies	17
3. Matériels et méthodes	19
3.1. Solutions.....	19
3.2. Culture cellulaire	19
3.3. Création de milieux conditionnés.....	20
3.4. Test de prolifération	20
3.5. Test de migration (scratch assay)	21
3.6. Génération de MDA-MB-231 OPA1 ^{-/-}	21
3.7. Transfection de siARN	21
3.8. Western blot.....	21
3.9. Immunofluorescence.....	22
3.10. Génération de cellules MDA-MB-231 CD63mcherry	23
3.11. Transmission de vésicules CD63+ de nos cellules cancéreuses aux cellules endothéliales	23
3.12. Modèle tumoral de souris	23
3.13. Immunofluorescence sur tissu tumoral.....	24
3.14. Quantification d'exosomes.....	24

Table des matières

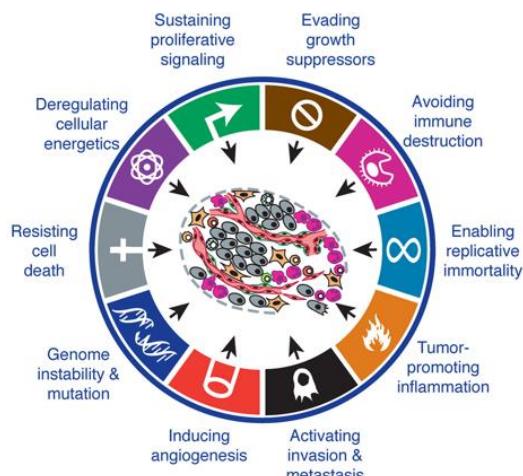
3.15. Co-culture.....	25
3.16. Quantification des ARN messagers.....	25
3.16.1. Extraction ARN.....	25
3.16.2. Transcription inverse (<i>Reverse transcription, RT</i>)	26
3.16.3. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (<i>Real-time polymerase chain reaction, qPCR</i>)	26
3.17. Tests statistiques	27
3.18. Liste des anticorps.....	28
4. Résultats.....	29
4.1. Caractérisation des cellules MDA-MB-231 OPA1 ^{-/-}	29
4.2. Étude du taux de prolifération des cellules déficientes en OPA1	29
4.3. Étude du taux de migration des cellules déficientes en OPA1.....	30
4.4. Étude de l'effet de l'inhibition d'OPA1 <i>in vivo</i>	31
4.5. Étude de l'effet de l'agent pharmacologique sur les vaisseaux sanguins	32
4.6. Étude de la prolifération des cellules HUVECs en co-culture avec des cellules MDA-MB-231 déficientes en OPA1	33
4.7. Étude de la migration des cellules HUVECs en co-culture avec des cellules MDA-MB-231 déficientes en OPA1	33
4.8. Étude de la prolifération des cellules HUVECs traitées avec du milieu conditionné de cellules MDA-MB-231 déficientes en OPA1	34
4.9. Étude de la migration des cellules HUVECs traitées avec du milieu conditionné de cellules MDA-MB-231 déficientes en OPA1	35
4.10. Étude du niveau d'expression de différents facteurs de croissance chez les cellules déficientes en OPA1.....	35
4.11. Étude de la biogenèse des vésicules extracellulaires CD63+.....	36
4.12. Étude de la production d'exosomes sur nos cellules déficientes en OPA1.....	37
4.13. Étude de la transmission de cellules CD63+ aux cellules endothéliales	37
4.14. Étude de la prolifération des cellules HUVECs traitées avec du milieu conditionné ultracentrifugé de cellules MDA-MB-231.....	38
4.15. Étude de la migration des cellules HUVECs traitées avec du milieu conditionné ultracentrifugé de cellules MDA-MB-231.....	39
5. Discussion.....	40
5.1. Conclusion et perspectives.....	42
6. Bibliographie	45

1. Introduction

1.1. Le cancer

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer est la seconde plus grande cause de décès dans le monde après les maladies cardiovasculaires. En Europe, 20 % des décès sont provoqués par le cancer.

Les principales caractéristiques intervenant dans le développement du cancer sont : la signalisation de prolifération continue, l'inhibition des suppresseurs de croissance cellulaire, l'activation de l'invasion et des métastases, la réplication cellulaire immortelle, l'induction de l'angiogenèse ainsi que la résistance à la mort cellulaire. De plus, il y a un peu plus d'une



dizaine d'années, quatre autres caractéristiques du cancer ont été proposées. Ces quatre caractéristiques sont la dérégulation de l'énergie cellulaire, la résistance de la destruction immunitaire, les tumeurs promouvant l'inflammation et l'instabilité du génome et ses mutations (Fig.1) (Hanahan et al., 2011).

Figure 1 : Représentation de toutes les caractéristiques du cancer (Hanahan et al., 2011).

1.1.1. Le cancer du sein

Le cancer du sein est l'un des cancers les plus diagnostiqués dans le monde (Vagia et al., 2020). Malgré cela, il reste le cancer le plus meurtrier chez les femmes, suivi de très près par les cancers pulmonaires et les cancers colorectaux. Nous retrouvons ensuite le cancer du col de l'utérus, spécifique des femmes (Fig.2). Il est estimé qu'une femme sur huit va développer un cancer du sein au cours de sa vie (Siegel et al., 2021).

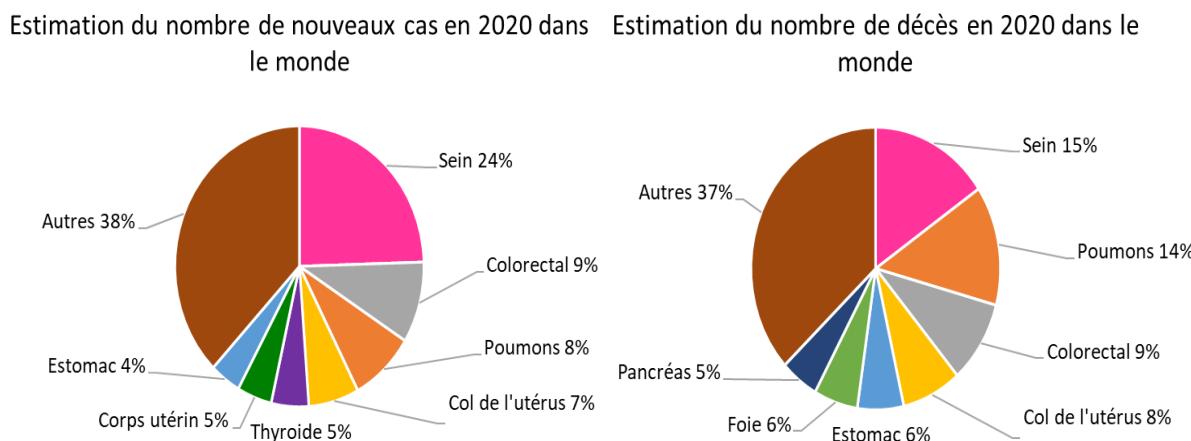


Figure 2 : Estimation du nombre de nouveaux cas de cancers et du taux de mortalité dans le monde entier chez la femme. En 2020, le cancer du sein est le cancer avec la plus grande incidence (total : 9 227 484) et avec le taux de mortalité (total : 4 429 323) le plus élevé. Estimations reprises et graphes inspirés du site de l'OMS.

Les cancers peuvent provenir de différentes causes : elles peuvent être génétiques ou non. Parmi les causes génétiques, on retrouve par exemple les mutations des gènes BRCA1 ou BRCA2 (*Breast cancer*). Ces deux gènes sont à la base des gènes suppresseurs de tumeurs permettant la réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) lorsque celui-ci est endommagé. Cependant, à la suite de mutations dans leurs gènes, BRCA1 et BRCA2 ne sont plus capables de réparer les dommages causés à l'ADN et finissent par devenir des protéines favorisant les cancers du sein ainsi que les cancers ovariens (Yoshida et al., 2004).

En ce qui concerne les causes non génétiques pouvant amener à un cancer du sein, il existe divers facteurs favorisants. L'ethnie, l'obésité, la consommation d'alcool, le fait d'avoir allaiter un enfant ou non en sont des exemples (Feng et al., 2018).

Pour le cancer du sein, il existe différents types de classifications. La première se base sur le type de cellules qui va proliférer perpétuellement. Celle-ci comprend les carcinomes et les sarcomes. Les carcinomes proviennent de cellules épithéliales du sein qui tapissent les lobules et les canaux (Fig.3). Les sarcomes proviennent quant à eux de cellules stromales comme les myofibroblastes ainsi que des cellules provenant des vaisseaux sanguins. Les sarcomes du sein sont cependant beaucoup plus rares (Feng et al., 2018).

On peut également classer les cancers du sein suivant leurs types moléculaires. Il est possible de distinguer les cancers du sein qui sont

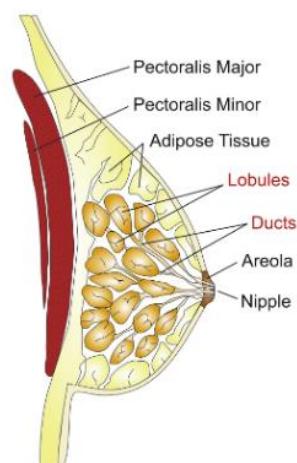


Figure 3 : Schéma anatomique du sein. Une grande majorité des cancers du sein proviennent des lobules et des canaux du sein (Feng et al., 2018).

positifs aux récepteurs hormonaux, ceux qui sont enrichis au récepteur HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*) et les cancers du sein triple négatif (TNBC, *Triple negative breast cancer*). Ces critères ont été définis sur base de leurs profils immunohistochimiques et la présence des différents récepteurs hormonaux que sont les récepteurs à la progestérone (PR), aux œstrogènes (ER) ainsi que l'absence du récepteur HER2 (Vagia et al., 2020).

1.1.2. Le cancer du sein triple négatif (TNBC, *Triple negative breast cancer*)

Le cancer du sein triple négatif est le cancer du sein avec le pronostic vital le plus faible. Il constitue entre 15 et 20 % des cancers du sein et il est le cancer le plus souvent découvert chez les femmes de moins de quarante ans (Feng et al., 2018). Il en existe différentes classifications en fonction de l'expression des gènes de ces cancers. Six sous-types différents sont retrouvables : deux sous-types basaux, un sous-type immunomodulateur, un sous-type mésenchymateux, un sous-type mésenchymateux de type cellule souche et un sous-type de récepteur luminal aux androgènes (Lehmann et al., 2011).

Le cancer TNBC peut donc provenir de différents types cellulaires qui sont tous dépourvus de récepteurs hormonaux à la progestérone et aux œstrogènes. De plus, la protéine HER2 n'est pas présente à la surface de ces cellules (Yin et al., 2020). Par conséquent, ces cellules ne sont pas sensibles aux traitements déjà existants contre les récepteurs hormonaux ou HER2. Il est donc devenu une priorité de comprendre et de traiter ce type de cancer pour lequel il existe que très peu de thérapies et seulement pour certains types de tumeurs. De plus, il semblerait que le TNBC est plus fréquent chez les femmes ayant une mutation du gène BRCA1 (Feng et al., 2018).

Cependant, les cellules cancéreuses du sein (mais aussi dans les autres types de cancer) ne se développent pas toutes seules. Elles font partie d'un tissus complexe qui comprend un grand nombre d'autres types cellulaires. Ce tissu complexe est appelé le microenvironnement tumoral.

1.2. Le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral (Fig.4), et plus particulièrement celui dans le cancer du sein comporte une variété de types cellulaires différents. En plus des cellules néoplasiques, le microenvironnement tumoral abrite des fibroblastes associés au cancer, des leucocytes, des adipocytes, des cellules endothéliales ainsi que des cellules myoépithéliales (Soysal et al., 2015).

Il s'avère que le microenvironnement tumoral devient un sujet d'étude de plus en plus important pour la progression tumorale et le développement de métastases. Le phénomène de l'angiogenèse, qui consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au sein de la tumeur afin d'irriguer les cellules tumorales qui prolifèrent massivement, est notamment important pour ce microenvironnement.

1.2.1. L'angiogenèse

L'angiogenèse est initiée par la réception de facteurs pro-angiogéniques. Ce sont les cellules endothéliales préexistantes qui vont recevoir ces facteurs. Parmi ces cellules, les « *tip cells* » sont des cellules se trouvant au niveau du front de germination. Ces cellules sont sensibles au facteur de croissance endothéial vasculaire (VEGF) et sont capables de créer des filopodes permettant l'orientation et la création des nouveaux vaisseaux sanguins. Les cellules précédant ces « *tip cells* » sont les « *stalk cells* ». Ces dernières sont les cellules qui vont principalement proliférer afin de donner ces nouveaux vaisseaux sanguins (Fig.5). À la suite de ce processus de prolifération, les cellules endothéliales vont devenir des cellules phalangiennes quiescentes (Zeng et al., 2021).

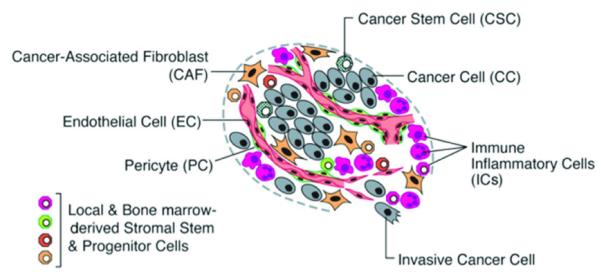


Figure 4 : Image représentant le microenvironnement tumoral. Souvent, seules les cellules cancéreuses sont mentionnées alors que les tumeurs contiennent une variété de types cellulaires différents (Hanahan et al., 2011).

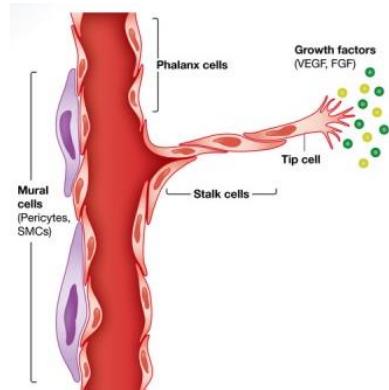


Figure 5 : Illustration d'un début d'angiogenèse induit par des facteurs de croissances. Les « *tip cells* » se trouvent au front de migration tandis que les « *stalk cells* » les précèdent (Wong et al. 2017).

Les cellules endothéliales tumorales peuvent être une des causes de la formation de métastases (Sobierajska et al., 2020). En effet, en raison de leur manque de maturité, les cellules phalangiennes quiescentes sont plus perméables au niveau tumoral. Ce défaut de maturité est dû au fait que les péricytes ne soutiennent pas encore assez les nouveaux vaisseaux sanguins (Xian et al., 2006). En effet, le recrutement des péricytes est une étape clé dans la formation et le maintien des vaisseaux sanguins. Le microenvironnement, dont fait partie les cellules endothéliales, joue un rôle primordial dans le développement d'une tumeur.

Comme dit précédemment, l'angiogenèse s'initie via des facteurs pro-angiogéniques. Ces facteurs sont d'importants moyens de communication au sein du microenvironnement tumoral. Ceci est valable non seulement avec les cellules endothéliales mais également avec tous les autres types cellulaires présents dans le microenvironnement tumoral. Parmi les moyens de communication entre cellules, il existe des facteurs extracellulaires comme des cytokines, des hormones, des facteurs de croissances ainsi que les vésicules extracellulaires (EVs) (Wu et al., 2017).

1.3. Les vésicules extracellulaires

Il existe différents types de contacts entre les cellules. Parmi ceux-ci, on distingue les contacts directs ainsi que ceux via des facteurs sécrétés, comme les cytokines ou encore les chimiokines. Cependant, ces dernières années, il s'est avéré que les vésicules extracellulaires apparaissent comme d'importants médiateurs dans la communication intercellulaire et notamment au sein du microenvironnement tumoral (Becker et al., 2016). Ils ont notamment été définis comme promouvant l'angiogenèse (Kosaka et al., 2013).

Les vésicules extracellulaires peuvent être divisées en deux catégories, les microvésicules et les exosomes. Il existe également un troisième type de vésicules extracellulaires que l'on appelle les corps apoptotiques. Ceux-ci sont produits lors de l'apoptose cellulaire (van Niel et al., 2018). Ces trois principaux types de vésicules extracellulaires sont différenciés par leurs origines.

1.3.1. Les exosomes

Les exosomes proviennent des endosomes précoce dans lesquels ils vont former des vésicules intraluminale (ILVs). Les ILVs sont formés via plusieurs complexes protéiques appelés les complexes de tri endosomique requis pour les machines de transport (ESCRT) (Zhang et al., 2019). C'est via une invagination de la membrane des endosomes que les ILVs vont être formés. Par la suite, ces endosomes précoce, en s'acidifiant, vont devenir des endosomes tardifs également appelés corps multivésiculaires (MVBs). Ceux-ci vont, par fusion avec la membrane plasmique, libérer leurs ILVs, correspondant aux exosomes (Fig.6) (Kowal et al., 2014; Zhang et al., 2019). La taille des exosomes fait aux alentours de 30 à 150 nm (Abels et al., 2016).

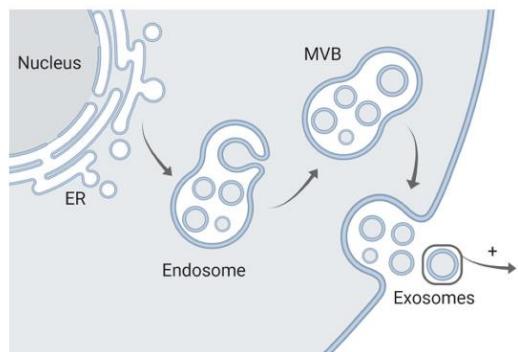


Figure 6 : Représentation schématique de la biogénèse des exosomes (Hofmann et al., 2020).

1.3.2. Les microvésicules

Les microvésicules proviennent quant à elles directement d'un bourgeonnement avec la membrane plasmique (Fig.7). Ces dernières ont une taille aux alentours de 50 à 500 nm

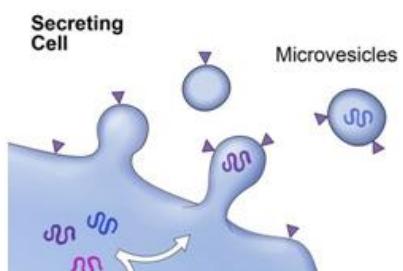


Figure 7 : Représentation de la biogénèse des microvésicules (Raposo et al., 2013).

(Ratajczak et al., 2020). Toutes ces vésicules extracellulaires contiennent une grande variété de molécules bioactives telles que de l'ADN, de l'ARN, des microARN, des protéines ainsi que des lipides (Abels et al., 2016).

Les vésicules extracellulaires sont produites en plus grand nombre dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules somatiques présentes au sein de notre corps (Bebelman et al., 2018). Il est de plus en plus remarqué que les métabolites libérés par les cellules cancéreuses influencent le microenvironnement tumoral. Le métabolisme, et donc les mitochondries, constitue dès lors une des voies intéressantes de thérapie contre le cancer. En effet, les mitochondries, ayant pour fonction la respiration cellulaire, jouent un rôle dans

l'agressivité des tumeurs. Cependant, il n'est pas possible d'inhiber la chaîne de phosphorylation oxydative, étape clé de la respiration cellulaire, sans avoir de lourds effets secondaires (Zamberlan et al., 2022). Néanmoins, comme les mitochondries sont fonctions de leur morphologie, il est intéressant de tenter de réguler celles-ci via leurs conformations.

1.4. Les mitochondries

Il y a plus d'1,5 milliards d'années, une alphaprotéobactérie, décrite comme étant l'ancêtre des mitochondries que nous connaissons actuellement, a subi une endosymbiose dans un progéniteur eucaryote (Nunnari et al., 2012; Pernas et al., 2015). En raison de cette endosymbiose et leur origine, les mitochondries sont des organites cellulaires comportant leur propre matériel génétique. Leur ADN est circulaire et de petite taille. Chez l'homme celui-ci fait 16.569 kb (kilobase) et est présent en plusieurs copies (Rodrigues et al., 2020). L'ADN mitochondrial code pour 13 protéines (Fig.8). Ces dernières jouent un rôle important dans la phosphorylation oxydative permettant la production d'adénosine triphosphate (ATP). Le reste de l'ADN mitochondrial code principalement pour des acides ribonucléiques (ARN) de transfert ainsi que deux ARN ribosomiaux (Chan, 2020).

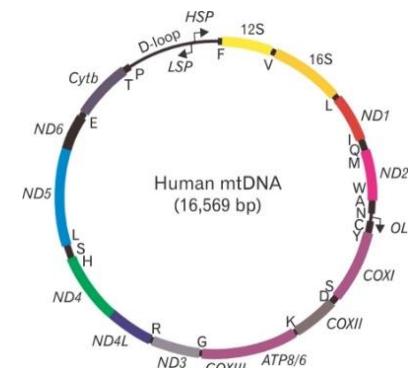


Figure 8 : Représentation schématique de l'ADN mitochondrial humain. Cet ADN circulaire code pour deux ARN ribosomiaux (12S et 16S), 22 ARN de transfert ainsi que 13 protéines. L'origine de réPLICATION est notée OL (origin of L-strain replication). HSP (heavy-strain promoter) et LSP (light-strain promoter) sont les régions non codantes servant de promoteur de transcription (Yoon et al., 2010).

1.4.1. L'architecture des mitochondries

Les mitochondries sont des organites doublement membranés. Ils comportent une membrane mitochondriale interne (IMM) et une membrane mitochondriale externe (OMM) (Fig.9). Ces deux membranes comportent des fonctions et des compositions différentes (Giacomello et al., 2020).

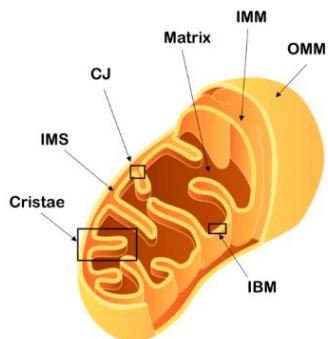


Figure 9 : Représentation schématique de l'architecture des mitochondries. Elles se composent de la membrane mitochondriale interne (IMM), la membrane mitochondriale externe (OMM), la matrice, les jonctions des crêtes (CJ), les crêtes mitochondrielles, la membrane limite interne (IBM), l'espace intermembranaire (IMS) (Protasoni et al., 2021).

1.4.2. La membrane mitochondriale externe

La membrane mitochondriale externe est composée d'une bicouche lipidique lisse. Les fonctions de la membrane mitochondriale sont notamment d'empêcher la diffusion de petites molécules (plus petites que 5000 Da (Dalton)) et de permettre la protection des mitochondries contre des produits nocifs (comme les espèces réactives à l'oxygène (ROS)) ainsi que des signaux de mort cellulaire. La OMM peut former des contacts, simultanés ou non, avec d'autres organites cellulaires tels que le réticulum endoplasmique, les lysosomes, le noyau ainsi que les ribosomes (Giacomello et al., 2020; Pernas et al., 2015).

1.4.3. La membrane mitochondriale interne

La membrane interne délimite la matrice mitochondriale et peut-être séparée en deux catégories. Tout d'abord, il y a la membrane limite interne qui est parallèle à la membrane mitochondriale externe. Les deux membranes ont des contacts très rapprochés via des complexes protéiques et enzymatiques qui permettent, entre autres, le passage de protéines (Pernas et al., 2015). Ensuite, il existe également des invaginations appelées crêtes mitochondrielles. Ces crêtes sont formées et maintenues via un complexe appelé MICOS (*mitochondrial contact site and cristae organizing system*) (Kozjak-Pavlovic, 2017). Ces crêtes mitochondrielles permettent une augmentation de la surface et comportent la machinerie de la respiration cellulaire (Giacomello et al., 2020).

1.4.4. Les fonctions des mitochondries

Le rôle majeur des mitochondries est la production de plus de 90 % de l'ATP nécessaire à la cellule grâce à l'oxydation des substrats du cycle de Krebs (Fig.10) et de la phosphorylation oxydative (Fig.11) (Rodrigues et al., 2020).

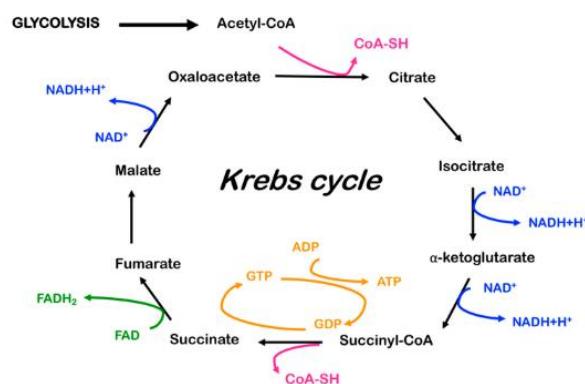


Figure 10 : Représentation du cycle de Krebs (aussi appelé cycle de l'acide citrique). Le cycle de Krebs se constitue de neuf réactions en chaîne qui sont réalisées par des enzymes. Ces réactions vont créer de la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et de la flavine adénine dinucléotide ($FADH_2$) ainsi qu'une molécule d'ATP (Protasoni et al., 2021).

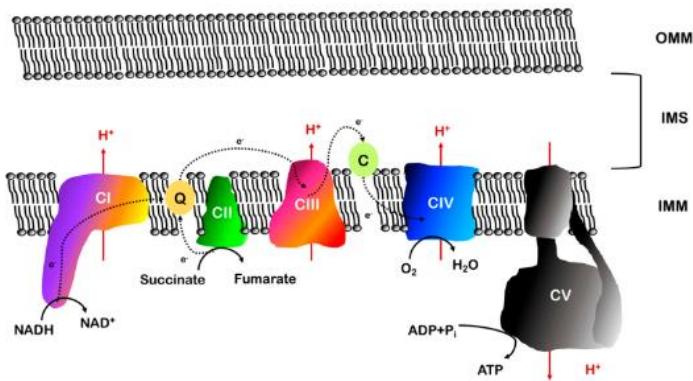
Figure 11 : La chaîne de transport d'électrons ainsi que la phosphorylation oxydative. La chaîne de transport d'électrons se compose de quatre complexes protéiques (CI, CII, CIII et CIV) et de deux porteurs d'électrons libres qui sont le coenzyme Q (Q) et le cytochrome C (C).

CI est le point d'entrée de la chaîne de respiration. Il va oxyder le NADH en NAD^+ et les électrons sont transférés au Q, permettant le pompage de 4 protons à travers l'IMM.

CII ne pompe pas de protons vers l'IMS mais transfère les électrons au Q.

Le CIII transfère les électrons du Q au C et pompe 4 protons.

CIV transfère les électrons du C vers l'accepteur final d'électrons qu'est l' O_2 . CIV va permettre le pompage de 2 protons. À la fin de la chaîne de transport d'électrons, les protons se trouvant dans l'IMS vont revenir dans la matrice mitochondriale grâce à l'ATP synthase. Cette action va permettre à l'adénosine diphosphate (ADP) de trouver son dernier phosphate manquant pour former de l'ATP (Protasoni et al., 2021).



De plus, ces organites jouent un rôle dans de nombreux processus métaboliques, comme la signalisation du calcium, le redox, l'apoptose, l'autophagie, la différentiation cellulaire ainsi que la régulation de la réponse immunitaire (Carafoli, 2003; Giacomello et al., 2020; Kasahara et al., 2014). La grande majorité des fonctions citées préalablement (Fig.12) sont régulées par la dynamique mitochondriale.

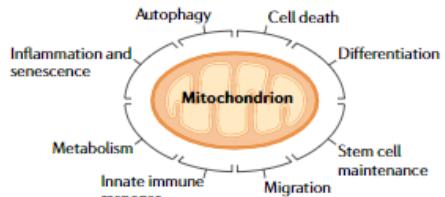


Figure 12 : Représentation de différents processus dans lesquels les mitochondries jouent un rôle (Giacomello et al., 2020).

1.5. La dynamique mitochondriale

Ces dernières années, les études ont démontré que les mitochondries sont en réalité des organites très dynamiques. Celles-ci sont capables de moduler leurs formes par la succession de fusion et de fission (Tilokani et al., 2018). L'équilibre entre la fission mitochondriale et la fusion répond rapidement à l'apport en éléments nutritifs, aux changements dans les besoins métaboliques cellulaires et à la demande/l'approvisionnement en ATP. Si une cellule est en manque d'ATP, c'est le processus de fusion mitochondriale que la cellule va réaliser. À l'inverse, lorsque la cellule contient suffisamment d'ATP, les mitochondries ont plus souvent tendance à se retrouver en état fractionné via le processus de fission mitochondriale (Tait et al., 2013).

Il existe un équilibre entre la fission et la fusion mitochondriale. Cet équilibre est régulé grâce à des protéines liées à la dynamine (Fig.13). La fission est principalement régulée par la protéine cytosolique appelée protéine liée à la dynamine 1 (DRP-1, *Dynamin-related protein 1*), tandis que la fusion mitochondriale est régulée par trois GTPases que sont mitofusine 1 (MFN1), mitofusine 2 (MFN2) qui se situent sur l'OMM ainsi que la protéine d'atrophie optique (OPA1) que l'on retrouve sur l'IMM (Lee et al., 2018).

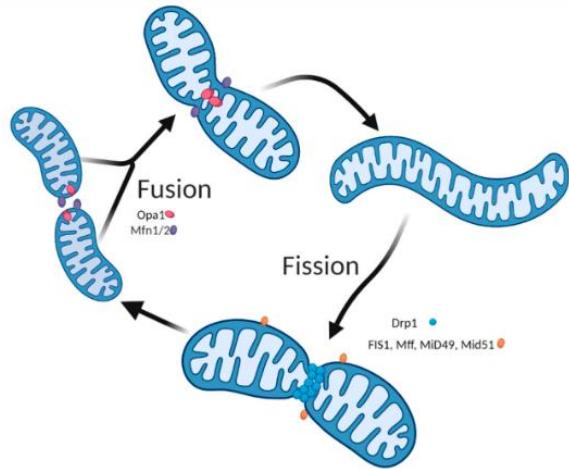


Figure 13 : Illustration de la dynamique mitochondriale. L'équilibre entre la fusion et la fission mitochondrielles est régulé par différentes protéines. Pour ce qui est de la fission mitochondriale, c'est essentiellement DRP-1 qui joue le rôle de scinder les mitochondries en deux. Le phénomène de fusion mitochondriale est pour sa part régulé par les protéines MFN1, MFN2 et OPA1 (Leduc-Gaudet et al., 2021).

1.5.1. La fission mitochondriale

La fission mitochondriale résulte d'un processus initial où une mitochondrie mère va donner deux mitochondries filles (Fig.14) (Tilokani et al., 2018). Ce processus de fission est principalement régulé par la protéine DRP-1, qui est une GTPase. DRP-1 est une protéine localisée dans le cytoplasme. En fonction de différentes modifications post-traductionnelles tels que la phosphorylation et la sumoylation, la protéine cytosolique va être acheminée vers la mitochondrie ou non (de Brito et al., 2010). Parmi les modifications post-traductionnelles, différentes phosphorylations se déroulent. Elles sont soit activatrices soit inhibitrices. De plus, il y a la déphosphorylation via la calcineurine qui active la translocation de DRP-1 vers la mitochondrie (Lima et al., 2018). Lors de la fission mitochondriale DRP-1 va être recruté par la protéine *fission mitochondrial 1* (FIS1). Celle-ci est une protéine située au niveau de la membrane mitochondriale externe (Losón et al., 2013). Le recrutement de DRP-1 est aussi médié par d'autres protéines de la OMM telles que le *mitochondria fission factor* (MFF) ainsi que les protéines dynamiques des mitochondries de 49 et 51 kDa (MID49 et MID51) (Rodrigues et al., 2020). Une fois que DRP-1 a été recruté, il change de conformation et se

polymérisé autour de la OMM. En utilisant sa fonction GTPasique, DRP-1 va rapprocher les membranes ce qui va permettre de séparer les mitochondries en deux (Yapa et al., 2021).

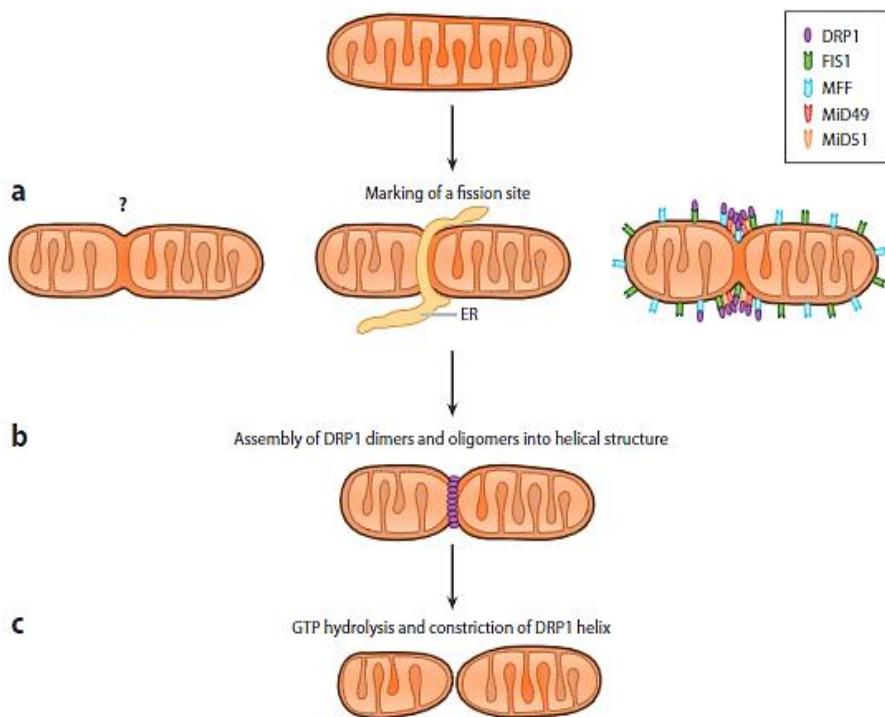


Figure 14 : Représentation schématique de la fission mitochondriale. Une fission de la IMM va d'abord être créée. Le processus exact n'est cependant pas encore connu. Ensuite, le réticulum endoplasmique (ER) va venir créer le site fission. Par la suite c'est DRP-1 qui va venir s'assembler autour du site de fission sous une structure hélicoïdale. L'hydrolyse de la GTP va permettre la séparation des OMM et donc la fission de la mitochondrie. Certaines étapes de la fission mitochondriale ne sont pas encore totalement bien comprises et élucidées (Pernas et al., 2015).

1.5.2. La fusion mitochondriale

Afin d'initier la fusion mitochondriale, il faut que deux mitochondries entrent en contact rapprochés (H. Chen et al., 2003). Dans un premier temps, les GTPases localisées dans la OMM, c'est-à-dire, MFN1 et MFN2, vont former des contacts hétéro-ou homotypiques et permettre la fusion des membranes externes (Fig.15) (Giacomello et al., 2020). MFN1 et MFN2 ont un haut niveau d'homologie et sont similaires structurellement, et pourtant, il a été décrit que ces deux protéines n'ont pas exactement les mêmes fonctions (Rojo et al., 2002). MFN1 joue un rôle exclusif au sein de la fusion mitochondriale. Tandis que MFN2, en plus d'être une protéine importante dans la fusion mitochondriale, est également impliquée dans les contacts entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique (de Brito et al.,

2008). MFN2 est également responsable de la maladie de Charcot de type 2A (Züchner et al., 2004).

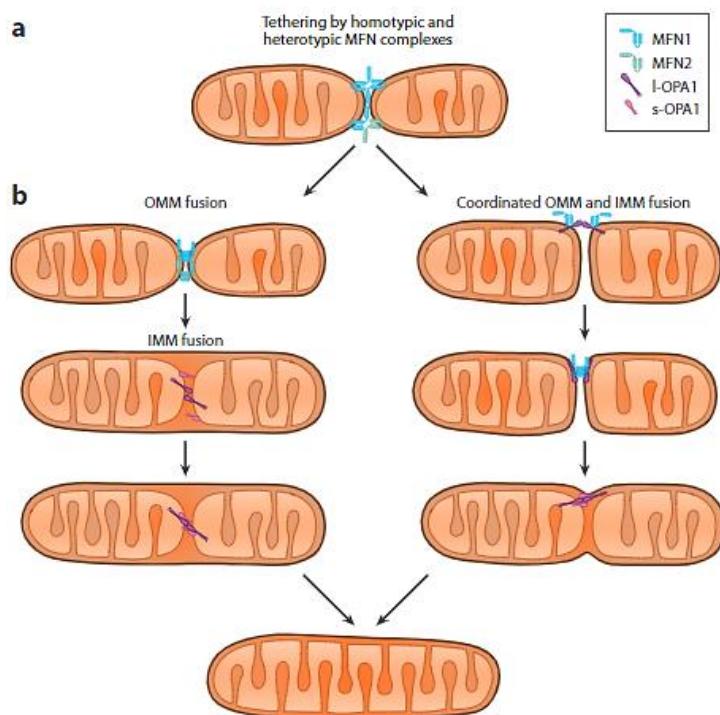


Figure 15 : Représentation schématique de la fusion mitochondriale. La fusion mitochondriale peut avoir lieu d'abord par fusion de l'OMM avant que n'intervienne la fusion de l'IMM. Elle peut également se faire en une seule étape par la coordination de la fusion de l'OMM et de l'IMM. Au départ, deux mitochondries sont présentes et celles-ci ne vont finalement former qu'une seule et grande mitochondrie (Pernas et al., 2015).

En ce qui concerne la fusion de la membrane interne, celle-ci est médiée par OPA1 (Fig.15). Cette GTPase fait, au même titre que MFN1 et MFN2, partie de la super-famille des dynamin (Giacomello et al., 2020). Cependant, contrairement à MFN1 et MFN2, OPA1 n'a pas besoin d'être présent dans les deux IMM pour que le processus de fusion se produise (Song et al., 2009). Il a été démontré qu'une diminution des mitofusines entraîne un blocage de la fusion de la OMM et IMM tandis que la perte de OPA1 a pour conséquence un blocage uniquement pour la IMM (Meyer et al., 2017). Un *knockout* (KO) de ces différentes GTPases, qui sont impliquées dans la fission et la fusion mitochondrielles, est létal pendant la phase embryonnaire chez les souris. Ces gènes sont donc importants dans le développement embryonnaire (Tilokani et al., 2018).

1.6. Optic Protein Atrophy 1 (OPA1)

OPA1 est une protéine dont le gène est situé sur le bras long du troisième chromosome (3q28) (Alexander et al., 2000). Cette protéine a une taille de plus de 100 kDa et son gène contient 31 exons (Lenaers et al., 2009). À la suite d'un épissage alternatif des exons 4, 4b et 5b (Fig.16), OPA1 peut exister sous huit ARN messagers différents ainsi que huit isoformes protéiques. Cependant, c'est l'ARN messager contenant l'exon 4 qui est le plus représenté au sein des tissus (A. Olichon et al., 2007).

La protéine de fusion mitochondriale comporte différents domaines au sein de sa séquence (Fig.16). Parmi ces domaines, il est possible de distinguer (D. Li et al., 2019):

- Une séquence de ciblage mitochondrial (N-terminal)
- Un domaine GTPase central qui est entouré de 2 hélices
- Un domaine effecteur GED (*GTPase effector domain*) (C-terminal)



Figure 16 : Représentation de la séquence d'OPA1. MTS (Mitochondrial targeting sequence), TM (domaine transmembrinaire), PH (pleckstrin-homology domain) qui sert de liaison avec les membranes lipidiques (D. Li et al., 2019).

Une mutation sur le gène d'OPA1 peut donner une maladie neurodégénérative du nerf optique amenant à une cécité. Cette maladie est nommée l'atrophie optique autosomique dominante (Alexander et al., 2000).

De plus, OPA1 peut être clivé par des protéases telles que la *Levure Mitochondrial Escape 1 Like 1 ATPase* (TME1L1) et les métalloendopeptidases OMA1 et YME1L (Bertholet et al., 2016). OPA1 existe donc sous deux autres formes que sont L-OPA1 (*long*) et S-OPA1 (*short*) (Fig.17). Un KO pour ces protéases entraîne une présence totale de la forme L-OPA1 (A. Olichon et al., 2007; Song et al., 2007).

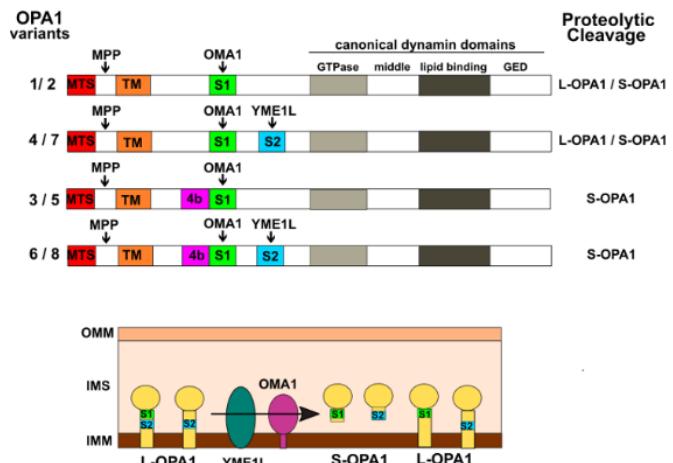


Figure 17 : Schéma représentant les différents sites de clivage d'OPA1 ainsi que les différents domaines au sein de la séquence (Rodrigues et al., 2020)

Ce clivage est visible lorsqu'on réalise un western blot OPA1 avec une plus grande bande pour L-OPA1 et les 3 petites pour S-OPA1. Pour la régulation de la fusion mitochondriale, l'équilibre des clivages d'OPA1 est important même si le rôle de la forme courte n'est pas encore totalement compris (Anand et al., 2014; Tilokani et al., 2018).

1.6.1. Les fonctions d'OPA1

Outre son rôle dans la fusion mitochondriale, OPA1 a été décrit comme jouant un rôle dans de nombreux autres processus comme la voie de signalisation de NFkB (Stéphanie Herkenne et al., 2020), l'homéostasie du calcium (Kushnareva et al., 2013), l'apoptose, (Cipolat et al., 2004; Aurélien Olichon et al., 2003), l'immunoprotection (Bertholet et al., 2016) mais également la maturation des cellules T mémoires (Corrado et al., 2021).

En plus des différents rôles cités précédemment, la protéine de fusion mitochondriale joue également un rôle dans la morphologie des crêtes mitochondrielles (Giacomello et al., 2020; Aurélien Olichon et al., 2003). Ceci est possible grâce à une auto-agrégation des complexes des formes L-OPA1 et S-OPA1 (Frezza et al., 2006). Les complexes d'OPA1 permettent de maintenir les jonctions des crêtes mitochondrielles serrées et empêchent la libération du cytochrome C (Scorrano et al., 2002). Le cytochrome C est une protéine mitochondriale qui se trouve à l'intérieur des crêtes et qui fait partie de la chaîne de respiration cellulaire (Mavridou et al., 2013). Les crêtes mitochondrielles sont, pendant l'apoptose, remodulées et la libération du cytochrome C peut s'effectuer (Fig.18). Cette libération permet l'induction de la cascade de caspases activant l'apoptose cellulaire. C'est en réalité la perturbation des complexes OPA1 qui va permettre ce remodelage apoptotique ainsi que libération du cytochrome C (Cipolat et al., 2004; Frezza et al., 2006).

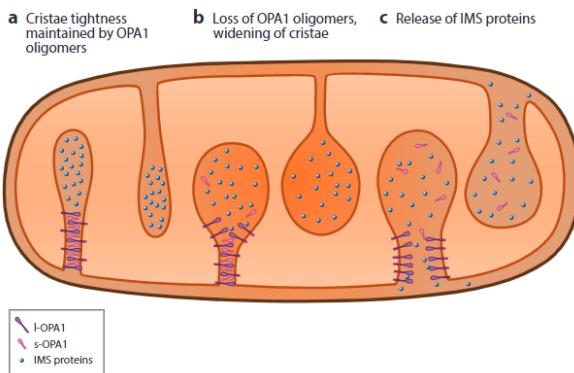


Figure 18 : Illustration représentant l'importance d'OPA1 dans l'assemblage et le maintien des crêtes mitochondrielles. a) L'étroitesse des crêtes est maintenue par des oligomères d'OPA1. b) Perte de ces oligomères et donc élargissement des crêtes. c) Libération des protéines de l'IMS dont fait partie le cytochrome C (Pernas et al., 2015).

De par cette fonction de remodelage des crêtes mitochondrielles, OPA1 permet également l'assemblage et le maintien du super-complexe de la chaîne respiratoire (Fig.11). En effet, une surexpression d'OPA1 augmente l'assemblage de la chaîne de phosphorylation oxydative et diminue l'espace entre deux crêtes (Cogliati et al., 2013). Un bon assemblage et un maintien de la chaîne de respiration cellulaire permettent aux cellules d'augmenter leur production d'ATP mais aussi de réduire leurs niveaux de production de ROS, accordant une meilleure survie à la cellule (Baker et al., 2019).

1.6.2. OPA 1 dans le cancer

Selon diverses recherches, il apparaît que l'ablation d'OPA1 diminue la progression tumorale de différents types de cancer comme l'hépatocarcinome cellulaire (M. Li et al., 2020), le cancer ovarien ou encore le TNBC, et cela sans en diminuer la respiration mitochondriale (Rodrigues et al., 2020). Il a également été remarqué que cette inhibition augmente les niveaux de trois microARN (miR148a, miR148b et miR152) (Zamberlan et al., 2022). De plus, une augmentation de la fusion mitochondriale médiée par OPA1 augmenterait la résistance aux chimiothérapies par le biais du remodelage des crêtes mitochondrielles (Rodrigues et al., 2020). En outre, il a également été démontré que OPA1 jouait aussi un rôle dans l'angiogenèse tumorale via la voie de signalisation NFkB qui joue sur l'expression des gènes de l'angiogenèse. OPA1 semble être un régulateur important de l'angiogenèse, de la croissance tumorale ainsi que de la formation de métastases (Stéphanie Herkenne et al., 2020). Il a même été décrit que l'inhibition d'OPA1 permettait de restaurer la sensibilité à certaines thérapies pharmacologiques dans le cas de leucémies myéloïdes aiguës (X. Chen et al., 2019).

Il a été constaté que OPA1 régule et a un effet sur bon nombre de caractéristiques du cancer. C'est donc pour cela que la protéine de fusion mitochondriale est dès à présent considérée comme étant une protéine que l'on peut cibler dans la thérapie contre le cancer (Stephanie

Herkenne et al., 2020). Récemment, le Dr. Scorrano, à découvert le premier agent pharmacologique inhibiteur d'OPA1, celui-ci est appelé MYLS22 (Stéphanie Herkenne et al., 2020). Cet inhibiteur pharmacologique semblerait bien inhiber OPA1 ainsi que la croissance tumorale (Stéphanie Herkenne et al., 2020; Zamberlan et al., 2022). À la suite d'une demande de brevet en cours, il n'est malheureusement pas possible de donner plus d'informations au sujet de cet inhibiteur pharmacologique.

2. Hypothèse, objectifs et stratégies

Il a été remarqué que OPA1 est significativement surexprimée dans les tissus tumoraux de la leucémie myéloïde aigue, des cancers du sein, du colon, de l'œsophage, du poumon, de l'ovaire, du pancréas, du rectum, des reins, de l'estomac, des testicules et de l'utérus (Fig.19). Il a également été remarqué que lorsque les ARN messagers d'OPA1 sont surexprimés chez les patientes atteintes de cancer du sein, le taux de survie diminue significativement (Fig.20). L'hypothèse selon laquelle OPA1 pourrait jouer un rôle dans le cancer du sein a donc été émise sur base de ces deux constatations.

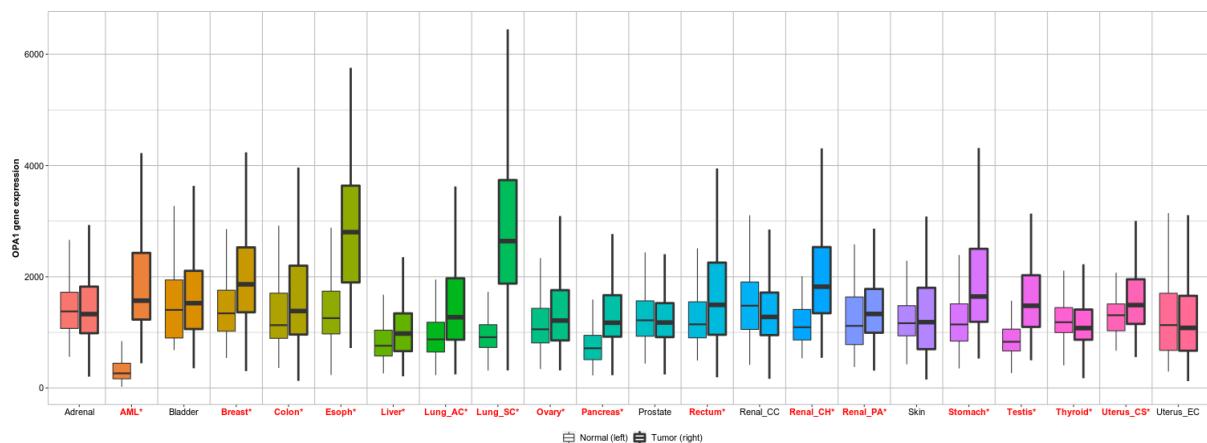


Figure 19. Graphique TNM de l'expression d'OPA1 dans tous les tissus dans les données disponibles de séquençage de l'ARN normal et tumoral ($n=15648$ échantillon normal, 40442 échantillon tumoral, $*P<0,05$. Les données sont restaurées à partir de <https://tnmplot.com> (Zamberlan et al., 2022)).

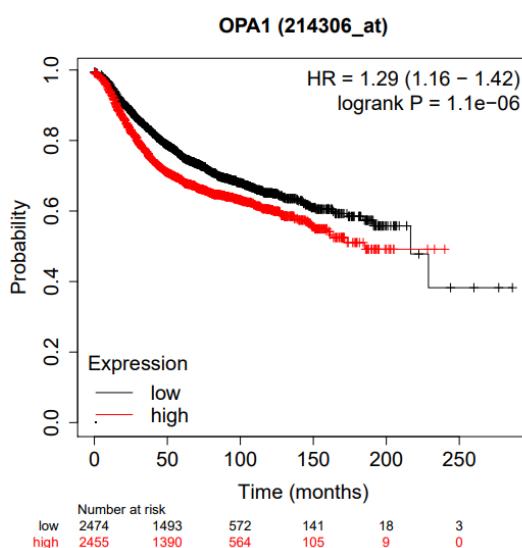


Figure 20. Courbe de Kaplan-Meier pour les patientes atteintes d'un cancer du sein avec des niveaux d'ARNm OPA1 élevés ou faibles. Les données sont restituées à partir du traceur Kaplan-Meier (<https://kmplot.com>). (*Id. aff. / Symbole du gène : 214306 at ; Survie : RFS (n=4934) ; Seuil de suivi : tous ; répartition sur la médiane*) (Zamberlan et al., 2022).

2. Hypothèses, objectifs et stratégies

L'objectif de ce travail va donc être de comprendre le rôle de la protéine OPA1, dans les cellules cancéreuses du sein (MDA-MB-231).

Pour ce faire dans un premier temps, nous allons évaluer les caractéristiques tumorales des cellules MDA-MB-231 déficientes pour la protéine OPA1. De plus, étant donné l'importance de trouver une nouvelle stratégie thérapeutique pour traiter les cancers du sein TNBC, nous allons évaluer le potentiel thérapeutique d'un nouvel inhibiteur d'OPA1 découvert durant le séjour post doctoral du Dr. Herkenne, MYLS22. Dans ce but, nous réaliserons une expérience *in vivo* dans laquelle des cellules MDA-MB-231 seront implanté orthotopiquement dans des souris. Lorsque les tumeurs auront atteint une taille de 50 mm³, nous commencerons un traitement avec MYLS22 afin d'essayer de mimer ce qu'il se passe au niveau hospitalier.

Enfin, nous souhaitons comprendre par quel mécanisme la protéine OPA1 facilite le développement du cancer du sein ainsi que le microenvironnement tumoral.

3. Matériels et méthodes

3.1. Solutions

- 1) Tampon 8,8 (Running) : Tris 1,5 M, pH 8,8.
- 2) Tampon 6,8 (Stacking) : Tris 0,5 M, pH 6,8.
- 3) Tampon de transfert 10X (1 L) : 144 g Glycine, 30 g Tris.
- 4) Tank buffer 10X (4 L) : 120 g Tris (30 g/L), 576 g Glycine (144 g/L), 40 g SDS (10 g/L).
- 5) SDS 10 % : 10 g SDS pour 100 mL
- 6) PBS 10X (1 L, pH 7,3) : 70,128 g NaCl, 100,3 g Na₂HPO₄.12H₂O, 3,4 g KH₂PO₄.
- 7) Trypsine (1 L, pH 7,6) : 0,05 % Trypsine, 0,2 % EDTA, PBS 1X (conservation à -20 °C).
- 8) Tampon de chargement (LB) 4X + β-mercaptoproéthanol : 2,5 mL Tris 1M pH 6,8, 0,8 g SDS, 4 mL Glycérol, 2 mL β-mercaptoproéthanol, 3 mL H₂O + bleu (+-500 µL 100X bleu de bromophénol 0,25 %).
- 9) TBS 10X (1 L, pH 7,4) : 30 g Tris, 150 g NaCl, 7,5 g KCl.
- 10) TBS-T 1X : 100 mL TBS, 1 mL Tween, 900 mL H₂O.
- 11) Blocking IF : Solution saponine contenant du PBS 5 % et BSA 0,5 %.
- 12) Tampon de lyse RIPA (50 mL) : 2,5 mL Tris pH 7,5 1M, 1,8 mL NaCl 4M, 500 µL CaCl₂ 1M, 250 µL NP-40 25 %, 2,5 mL Sodium deoxycholate 5 %, 500 µL SDS 10 %, H₂O (pour atteindre 50 mL), ajout dans 10 mL de solution d'inhibiteurs de protéases et/ou de phosphatases.
- 13) Paraformaldéhyde (PFA 4 %) : 500 mL PBS, 20 g PFA, 40 µL NaOH 1M.

3.2. Culture cellulaire

Toutes les cellules ont été cultivées à 37 °C dans une atmosphère humide avec 5 % de CO₂. Les cellules de l'adénocarcinome du sein humain MDA-MB-231 (American Type Culture Collection-HTB26 ; sexe : F, Manassas, USA) ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermofisher, Massachusetts, USA) 1 g/L glucose supplémenté de 10 % de sérum bovin fœtal (FBS) et 1 % d'un mélange d'antibiotiques (Streptomycine et Pénicilline). Les cellules HUVECs (Lonza-C2519A, Bâle, Suisse) sont cultivées en *coating* préalablement les boîtes de culture avec du PBS contenant de la gélatine 0,2 % dans du milieu

EGM-2 (Endothelial Cell Growth Medium-2 bulletkit) (Lonza) avec 5 % de FBS et 1 % d'un mélange d'antibiotiques.

3.3. Création de milieux conditionnés

Le milieu conditionné de cellules MDA-MB-231 WT et OPA1^{-/-} a été créé à partir de DMEM qui a été supplémenté avec du sérum. Ce sérum a été préalablement ultracentrifugé (UC) à 25 000 RPM (Rotation par minute) (Optima XPN-80 Ultracentrifuge : Beckman Coulter, Californie, USA) over night afin de retirer le plus de vésicules extracellulaires possible qui seraient présentes dans le sérum. Le milieu de culture est récupéré après 48 heures. De plus, une autre condition à partir de ce milieu de culture a été réalisée via ultracentrifugation à 25 000 RPM over night et le surnageant est ensuite récupéré. Ceci permet de retirer le maximum de vésicules extracellulaires que les MDA-MB-231 WT et OPA1^{-/-} ont produites et relâchés dans le milieu.

A la fin de ce processus il y a donc la création de quatre milieux conditionnés :

- MDA-MB-231 WT exo
- MDA-MB-231 OPA1^{-/-} exo
- MDA-MB-231 WT UC
- MDA-MB-231 OPA1^{-/-} UC

Les cellules HUVECs seront traitées avec ces différents milieux lors des tests fonctionnels qui ont été réalisés.

3.4. Test de prolifération

Les cellules MDA-MB-231 ont été semées dans une plaque 96 trous avec 100 µl de DMEM 1 g/L de glucose et 8 000 cellules par trou pendant 72 heures. Les cellules ont été traitées, pendant 16 heures, avec un analogue de la thymidine, le 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU). L'incorporation du BrdU dans l'ADN a été mesurée via le kit « Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) » (Roche Applied Science, Bâle, Suisse) selon le protocole du fabricant.

Des tests de prolifération ont été réalisés avec un traitement au milieu conditionné (MC). Nos cellules HUVECs ont été traitées pendant 24 heures avec le milieu conditionné

(25 % MC/75 % DMEM) avant réalisation du test et le BrdU a également été ajouté dans le milieu 16 heures auparavant.

3.5. Test de migration (scratch assay)

Les cellules MDA-MB-231 ont été semées dans une plaque 48 puits avec 500 µl de DMEM 1 g/L de glucose et 120 000 cellules par puits pendant 72 heures. Le scratch a été réalisé avec une tête de tips de 200 µl. La migration des cellules est mesurée au temps 0 et après 6 heures.

Des tests de migration ont aussi été réalisés avec un traitement au milieu conditionné. Nos cellules HUVECs ont été traitées pendant 24 heures avec le milieu conditionné (25 % MC/75 % DMEM) avant réalisation du test. Les cellules sont toujours sous traitement pendant toute la durée du test.

3.6. Génération de MDA-MB-231 OPA1^{-/-}

Les cellules MDA-MB-231 OPA1^{-/-} ont été générées en utilisant la technologie CRISPR/Cas9.

3.7. Transfection de siARN

Dans une boite de culture cellulaire (Greiner bio-one, Vilvoorde, Belgique) 60x15 mm, 360 000 cellules MDA-MB-231 ont été semées. Les transfctions ont été réalisées avec différents siARN : Un scramble (SC) (AM4635, Ambion, Massachusetts, USA) ou OPA1 (144409, Invitrogen, Massachusetts, USA) avec du Dharmafect-4 (Dharmacon, Lafayette, USA) qui est un agent de transfection. Ensuite, 2 µL de siARN ont été mélangés avec 398 µL de milieu DMEM 1 g/L glucose et 2 µL de Dharmafect-4 avec 398 µL de DMEM 1 g/L glucose (quantités pour une boite de 60x15mm). Par la suite, les deux mélanges sont combinés, pendant 20 minutes (ceci a pour but d'intégrer le siARN dans le Dharmafect-4) avant de les injecter dans le milieu avec les cellules en culture.

3.8. Western blot

Les cellules ont été lysées avec du tampon de lyse RIPA, puis centrifugées à 16 000 RPM pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines y est récupéré et il est chauffé pendant 10 minutes à 95 °C (le culot contient tous les débris cellulaires). Le dosage protéique est réalisé via le kit « BCA Protein Assay Kit » (Thermo Scientific) selon le protocole

du fabricant. La migration est réalisée dans un gel 10% SDS-PAGE et le transfert sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF). Les membranes sont par la suite saturées pendant une heure à température ambiante avec de la BSA (Albumine de sérum bovin) 5% diluée dans du tert-butyldiméthylsilyle et 0,1 % de Tween 20 (TBS-T). Les membranes sont par la suite incubées avec un anticorps primaire (dilution 1:1000) à 4°C over night dans du TBS-T et de la BSA 0,5%. Après 3 lavages au TBS-T, un anticorps secondaire (dilution 1:2000) approprié a été ajouté pendant une heure. Après 3 lavages au TBS-T et un lavage au TBS, les bandes sont visualisées via le kit « ECL Western Blotting Substrate » (Thermofisher) ou le kit « ECL Plus Western Blotting Substrate » (Thermofisher). Les membranes ont été imbibées de substrat puis sont superposées avec un film CL-Xposure (Thermofisher). Le film est ensuite passé dans un processeur de film CP1000 (Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgique).

3.9. Immunofluorescence

Les cellules MDA-MB-231 transfectées SC et siOPA1 ont été cultivées sur des lames couvre-objets pendant 48 heures puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 30 minutes à température ambiante sous hotte chimique. Ensuite, un lavage au PBS puis une mise au réfrigérateur over night imbibées de PBS est réalisé. La pose d'un blocking IF sur les lames couvre-objets et ensuite de 50 µL d'anticorps primaire CD63 (une tétraspanine, marqueur de vésicules extracellulaires) de souris et TOM20 (*Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 20*) de lapin (marqueur mitochondrial) sur la lame couvre-objet avec une dilution 1:100 pendant une heure est effectuée. Un lavage au PBS est réalisé puis les anticorps secondaires, un anti-souris et un anti-lapin, avec une dilution 1:100 sont posés pendant une heure. Par la suite, un lavage au PBS puis mise sur la lame porte objet de 3 µl de Prolong + DAPI qui vont permettre respectivement la fixation du montage et la coloration des noyaux en bleu est réalisés. Assemblage puis séchage pendant 30 minutes des lames avant d'être conservées à 4 °C à l'abri de la lumière. La visualisation se réalise à l'aide du microscope confocal (Zeiss LSM880 AiryScan Elyra S1, New-York, Etats-unis).

3.10. Génération de cellules MDA-MB-231 CD63mcherry

Les cellules MDA-MB-231 CD63mcherry ont été créés via la transfection d'un lentivirus contenant un plasmide codant pour CD63 suivi de la protéine mcherry. La sélection des cellules ayant intégré ce gène a été réalisé grâce à un gène de résistance à la blasticidine.

3.11. Transmission de vésicules CD63+ de nos cellules cancéreuses aux cellules endothéliales

Mise en culture et transfection d'un SC et d'un siOPA1 de 360 000 cellules MDA-MB-231 CD63 mcherry dans une boite de culture 60x15 mm. Après 24 heures ces cellules sont mises en culture sur un insert Transwell (Corning, Massachusetts, États-Unis) contenant une membrane poreuse de 0,4 µm qui permet uniquement le passage de vésicules extracellulaires. Entre temps, des cellules HUVECs sont également mises en culture sur des plaques 24 puits. Après 72 heures les cellules sont mises en co-culture. Ensuite, après 6 à 8 heures de co-culture, les cellules HUVECs sont photographiées à l'aide d'un microscope confocal et la visualisation des vésicules CD63+ qui ont passé la membrane peut être réalisée.

3.12. Modèle tumoral de souris

Modèle d'adénocarcinome MDA-MB-231 mammaire. Les cellules MDA-MB-231 WT confluentes ont été trypsiniées puis lavées et resuspendues dans du PBS. Injection de la suspension cellulaire (50×10^3 cellules dans 100 µl de Matrigel) de MDA-MB-231 dans la quatrième glande mammaire dans le bas ventre de chaque souris. La croissance tumorale des cellules a été évaluée en mesurant la longueur et la largeur de chaque tumeur tous les deux jours via un pied à coulisse. Le calcul du volume de la tumeur est réalisé en multipliant la longueur x la largeur mesurée x 0,5. Trente-six jours après l'injection des cellules tumorales, les souris ont été euthanasiées, et leurs tumeurs récoltées. Pendant cette période les souris ont été traitées avec un inhibiteur pharmacologique d'OPA1 (MYLS22) qui a été injecté à raison de 10 mg/kg de souris tous les deux jours en peritumoral. Celui-ci est dilué dans de l'huile de maïs avec de l'éthanol. Du DMSO a subi les mêmes dilutions pour servir de contrôle.

Cette expérience *in vivo* a été approuvée par la commission d'éthique de l'utilisation des animaux de l'Université de Liège. Le numéro d'acceptation du comité éthique est le 2166. Une dissection des tumeurs a été réalisée.

3.13. Immunofluorescence sur tissu tumoral

Les tumeurs de souris traitées et non traitées ont été fixées au PFA (4 %). Par la suite, elles sont plongées dans du sucre afin que les prélèvements gardent leurs aspects et ne se dessèchent pas. Ensuite, les tumeurs ont été incorporées dans du Tissue-Tek OCT Compound (Sakura Finetek, Villeneuve-d'Ascq, France) et conservées dans un congélateur à -80°C. Le jour de la réalisation des coupes, une trancheuse Leica CM3050 S (Leica Biosystems, Wetzlar, Allemagne) a été utilisée pour couper les tumeurs. Cette trancheuse permet de faire des coupes de 0,6 µm d'épaisseur. Lors de la réalisation de l'immunomarquage, les tissus sont entourés avec du Dakopen (Agar Scientific Ltd, Essex, Royaume-Uni) puis les tumeurs sont fixées dans de l'acétone pendant 15 minutes à 4°C. Le Dakopen est ensuite repassé autour des tumeurs, puis celles-ci sont incubées pendant 30 minutes dans une solution de PBS avec 5 % de sérum, 0,3 % de triton et 0,2 % de BSA dans le but de saturer les sites aspécifiques. Après les 30 minutes d'incubation à température ambiante, la même solution sans la BSA est utilisée pour diluer nos anticorps CD31 et actine smooth (dilution 1:250). Après une heure d'incubation, les lames sont rincées avec du PBS contenant 5 % de sérum et 0,3 % de triton. Par la suite, elles sont incubées avec un anticorps secondaire (dilution 1:500) et du DAPI (dilution 1:1000). Elles sont rincées au PBS après une heure d'incubation puis montage sur lame avec du Prolong + DAPI. La visualisation est ensuite réalisée à l'aide d'un microscope confocal (Zeiss Apotome 2).

3.14. Quantification d'exosomes

Mise en culture de 360 000 cellules MDA-MB-231 WT et OPA^{-/-} dans trois boîtes de culture cellulaire 60x15 mm. Après 24 heures, changement de milieu de culture DMEM 1 g/L glucose pour y ajouter du milieu contenant du DMEM 1 g/L glucose avec du sérum exofree afin de quantifier par la suite uniquement les vésicules produites par les cellules cancéreuses. Après 72 heures, le milieu de culture est récupéré. Toutes les centrifugations sont réalisées à 4°C. La première centrifugation (Allegra X-15R Centrifuge Beckman Coulter) se réalise à 2000 g

pendant 20 minutes afin de retirer les débris cellulaires qui seraient dans le milieu. Changement de Falcon et la seconde centrifugation (Avanti J-E Beckman Coulter) peut démarrer pendant 45 minutes à 12 000 g afin d'éliminer la majorité des microvésicules. Par la suite, les tubes sont filtrés via un steriflip (Milipore Express, Darmstadt, Allemagne) qui contient une membrane poreuse de 0,22 µm ne laissant ainsi passer que les très petites vésicules. Après cette filtration, une première ultracentrifugation (L7-55 Ultracentrifuge Beckman, Californie, USA) à 25 000 RPM est réalisée pendant 2 heures. Seul le culot est gardé et du PBS est rajouté dans nos tubes afin de réaliser un lavage toujours sous ultracentrifugation de 25 000 RPM pendant 2 heures. Le fond de culot est récupéré dans un Eppendorf, puis injection avec une dilution 1:50 (PBS) dans le Nanosight (Nanosight NS300 Malvern Panalytical, Malvern, Royaume-Uni) afin de quantifier le nombre de vésicules qui étaient présentes dans les différents milieux de culture.

3.15. Co-culture

Dans des plaques 24 trous, 180 000 cellules HUVECs ont été semées avec 400 µL de EGM-2. De plus, 30 000 cellules MDA-MB-231 WT SC ou siOPA1 ont été semées avec 100 µL de DMEM sur des inserts ayant une membrane poreuse de 0,4 µm et 600 µL de DMEM dans la chambre du bas. Après 48 heures, les cellules sont mises en co-culture et un test de prolifération ou un scratch assay a été réalisé comme décrit respectivement en section 3.4. et 3.5.

3.16. Quantification des ARN messagers

Mise en culture de 360 000 cellules MDA-MB-231 WT et OPA^{-/-} ainsi que transfectées avec SC et siOPA1 dans des boîtes de culture cellulaire (Greiner bio-one) 60x15 mm. Après 72 heures, une extraction d'ARN a été réalisée.

3.16.1. Extraction ARN

Pour commencer, le milieu de culture est retiré et 1mL de Trizol (Ambion by LifeTechnologies, Californie, USA) est ajouté dans chaque boîte de culture, ce qui va permettre de lyser les cellules. Les cellules sont *scrapées* puis transférées dans un tube Eppendorf 1,5 mL afin d'y ajouter 0,2 mL de chloroforme dans chaque échantillon. L'Eppendorf est mélangé vigoureusement à la main pendant 10 secondes puis laissé au repos pendant 3 minutes à

température ambiante. Ensuite, une centrifugation à 4°C pendant 15 minutes est réalisée à une vitesse de 14 000 g. Le surnageant incolore contenant les ARN est récupéré et transféré dans un nouveau tube Eppendorf. Dans ce nouveau tube, 500 µL d'isopropanol 100 % est ajouté et les tubes sont retournés une dizaine de fois, puis laissés au repos à température ambiante pendant 10 minutes. La même centrifugation que celle précédemment décrite est réalisée, cette fois-ci en ne gardant que le culot. Ensuite, 500 µL d'éthanol 75 % sont ajoutés à ce culot. Les échantillons sont brièvement vortexés puis centrifugés pendant 10 minutes à 4°C à 14 000 g. Le surnageant est retiré, puis les échantillons sont laissés ouverts afin de laisser s'évaporer le reste d'éthanol pendant 5 à 10 minutes. Notre ARN finit par être élué avec 25 µL d'H₂O. L'ARN est ensuite dosé grâce au NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). Une fois dosé, les ARN peuvent être conservés au congélateur à -80 °C.

3.16.2. Transcription inverse (*Reverse transcription, RT*)

Par tube, 1 µg d'ARN est chargé ainsi que 4 µL de SuperMix, contenant une transcriptase inverse Luna thermostable permettant la synthèse d'un ADNc, provenant du kit « LunaScript RT SuperMix Kit » (New England Biolabs, Massachusetts, États-Unis). Des amorces aléatoires (hexamères et oligomères) venant du kit sont utilisées. Le volume total est de 20 µL. Les échantillons sont placés dans le thermocycleur (T3 Thermocycler Biometra Westburg, GK Leusden, Pays-Bas) durant 15 minutes selon le cycle :

- Mise à température des échantillons à 25°C pendant 2 minutes.
- Synthèse de l'ADNc à 55°C pendant 10 minutes.
- Inactivation de l'enzyme à 95°C pendant 1 minute.

Les ADNc sont dilués dans 180 µL d'eau RNase-free. Les échantillons sont préservés à -20 °C si besoin.

3.16.3. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (*Real-time polymerase chain reaction, qPCR*)

La solution contenant les ADNc est déposée dans les puits d'une plaque PCR de 384 puits, avec de l'eau RNase-free et du SYBR Green (Eurogentec, Seraing, Belgique) se liant à l'ADN double brin afin de les colorer.

Pour un puits : 1 µL d'H₂O, 2 µL de ADNc, 7,5 µL de SYBR Green et 4,5 µL d'amorces (préalablement mélangées 2,5 µL de *forward* et *reverse* dans 495 µL d'H₂O).

Gènes	Amorces	Séquences
FGF	Sens (<i>Forward</i>)	5'-CCC-GAC-GGC-CGA-GTT-GAC- 3'
FGF	Anti-sens (<i>Reverse</i>)	5'-AC-ATT-TAG-AAG-CCA-GTA-ATC-T- 3'
PAI-1	Sens (<i>Forward</i>)	5'-CG-TGG-TTT-TCT-CAC-CCT-ATG- 3'
PAI-1	Anti-sens (<i>Reverse</i>)	5'-CAT-GCC-CTT-GTC-ATC-AAT-CTT-G- 3'
VEGF	Sens (<i>Forward</i>)	5'-CTC-TAC-CTC-CAC-CAT-GCC- 3'
VEGF	Anti-sens (<i>Reverse</i>)	5'-TGC-GCT-GAT-AGA-CAT-CCA-TGA- 3'
B2M	Sens (<i>Forward</i>)	5'-CAT-GGC-TCG-GAA-CTG- 3'
B2M	Anti-sens (<i>Reverse</i>)	5'-AT-GTG-AGG-CGG-GTG-GAA-CTG- 3'
PPIA	Sens (<i>Forward</i>)	5'-CGA-ACA-CAA-ATG-GTT-CCC-AGT- 3'
PPIA	Anti-sens (<i>Reverse</i>)	5'-CCA-TGG-CCT-CCA-CAA-TAT-TCA- 3'

Les gènes PPIA (peptidylprolyl isomérase A) et B2M (microglobuline bêta 2) sont utilisés comme gènes de référence. Les amorces sont mises en *triplicata* et les échantillons sont ajoutés. La plaque est rapidement centrifugée à 1000 g et les échantillons sont insérés dans le thermocycleur quantitatif 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) selon le cycle suivant :

- Dénaturation à 95°C durant 5 secondes.
- Hybridation des amorces à 65°C durant 15 secondes.
- Elongation à 72°C durant 15 secondes grâce à une ADN polymérase contenue dans le kit « LunaScript RT SuperMix Kit ».

Les étapes sont répétées 40 fois.

3.17. Tests statistiques

Les tests statistiques de ce mémoire ont été réalisés sur Graphpad Prism 7. Tous les tests sont des tests t de Student comparant 2 conditions. Les valeurs sont dites significatives à partir du moment où la P valeur est égale ou inférieure à 0,05.

3.18. Liste des anticorps

Produits	Firmes	Identifiants
ANTICORPS PRIMAIRE		
Mouse anti-Actine	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)	sc-8432
Mouse anti-Opa1	BD-Biosciences	612607
Rabbit anti-Tom20 (FL-145)	Santa Cruz Biotechnology	sc-11415
Mouse anti-CD31	Thermofisher	MA3105
Anti-Actin- α -smooth muscle-CY3	Sigma Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA)	C6198
ANTICORPS SECONDAIRE		
Anti-rabbit HRP-linked	Cell signaling	7074S
Anti-mouse HRP-linked	Cell signaling	7076S
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	Life Technologies	A11070
Alexa Fluor 568 Goat anti-mouse IgG	Thermo fisher	A-11019

4. Résultats

4.1. Caractérisation des cellules MDA-MB-231 OPA1^{-/-}

En vue de déterminer la fonction de la protéine mitochondriale OPA1 dans les cellules cancéreuses du sein, nous allons étudier les caractéristiques des cellules cancéreuses MDA-MB-231 lorsque la protéine mitochondriale de fusion n'est pas présente. Dans ce but, des cellules MDA-MB-231 KO pour OPA1 (OPA1^{-/-}) ont été générées par la technique de Crispr Cas9 par le Dr. Herkenne. Dans un premier temps, nous avons réalisé un western blot afin de nous assurer que nos cellules MDA-MB-231 OPA1^{-/-} sont bien déficientes en OPA1. Comme montré dans la figure 21, les cellules OPA1^{-/-} n'ont pas de protéines OPA1 détectées (Fig.21). Afin de nous assurer que les phénotypes des cellules OPA1^{-/-} observés sont bien dus à la délétion de la protéine OPA1 et non à l'apparition d'effets compensatoires, nous avons également examiné les effets de la délétion transitoire d'OPA1 par siARN des cellules MDA-MB-231. Comme montré dans la figure 22, la transfection des cellules MDA-MB-231 avec un siARN OPA1 diminue efficacement le niveau protéique d'OPA1 (Fig.22).



Figure 21 : Western Blot permettant la caractérisation des cellules MDA-MB-231 OPA1^{-/-}.

Figure 22 : Western Blot permettant la caractérisation des cellules MDA-MB-231 transfectées avec un siOPA1. Les cellules ont été transfectées pendant 72 heures avec un SC ou un siOPA1.

4.2. Étude du taux de prolifération des cellules déficientes en OPA1

Dans le but de déterminer si la protéine OPA1 joue un rôle dans les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231, nous avons évalué la prolifération des cellules déficientes ou KO pour OPA1.

La délétion d'OPA1 altère de façon significative la prolifération des cellules MDA-MB-231 (Fig.23 et 24).

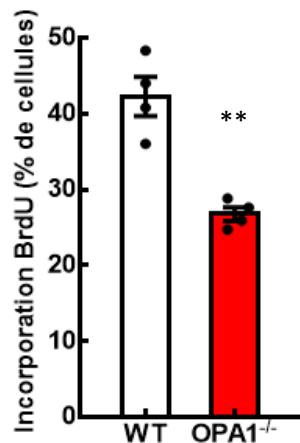


Figure 23 : Test de prolifération sur les cellules MDA-MB-231 WT ou OPA1^{-/-}. Chaque point représente une expérience indépendante ($n=4$). La P valeur = 0,0013.

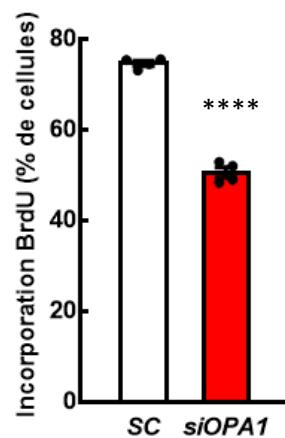


Figure 24 : Test de prolifération sur les cellules MDA-MB-231 SC ou siOPA1. Les cellules ont été transfectées pendant 72 heures avec un SC ou un siOPA1. Chaque point représente une expérience indépendante ($n=4$). La P valeur est <0,0001.

4.3. Étude du taux de migration des cellules déficientes en OPA1

Une autre étape clé dans le développement tumoral est la migration des cellules cancéreuses. Par conséquent, nous avons évalué la migration des cellules MDA-MB-231 transfectées ou KO pour OPA1.

La délétion d'OPA1 altère la migration des cellules MDA-MB-231 de façon significative (Fig.25 et 26).

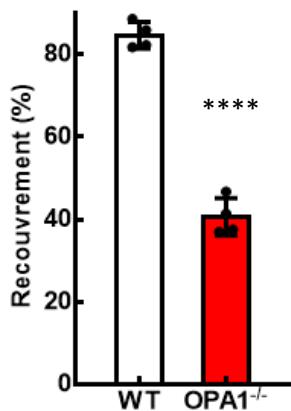


Figure 25 : Test de migration sur les cellules MDA-MB-231 WT ou OPA1^{-/-}. Chaque point représente une expérience indépendante ($n=4$). La P valeur est <0,0001

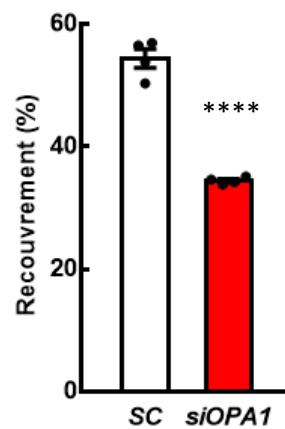


Figure 26 : Test de migration sur les cellules MDA-MB-231 SC ou siOPA1. Les cellules ont été transfectées pendant 72 heures avec un SC ou un siOPA1. Chaque point représente une expérience indépendante ($n=4$). La P valeur est <0,0001

4.4. Étude de l'effet de l'inhibition d'OPA1 *in vivo*

Etant donné que nos résultats *in vitro* suggèrent un rôle de la protéine OPA1 dans les cellules MDA-MB-231 ainsi que des expériences *in vivo* réalisées précédemment dans le laboratoire démontrent une nette réduction de la croissance des tumeurs MDA-MB-231 OPA1^{-/-} implantées en orthotopique dans des souris NOD SCID, nous avons voulu déterminer le potentiel thérapeutique de l'inhibition d'OPA1.

Durant le séjour post-doctoral du Dr. Herkenne, une expérience de criblage à partir de 12 000 composés chimiques a permis d'identifier un nouvel inhibiteur de l'activité GTPase de la protéine OPA1, MYLS22 (Stéphanie Herkenne et al., 2020). Il est important de noter que toutes les fonctions de la protéine OPA1 sont dépendantes de son activité GTPase.

Nous avons décidé de réaliser une expérience *in vivo* afin de déterminer le rôle d'OPA1 lors de la croissance tumorale.

Pour ce faire, nous avons implanté des cellules MDA-MB-231. Une fois que les tumeurs ont atteints un volume de 50 mm³, un traitement en péri tumoral avec MYLS22 (10 mg/kg de souris) a été effectué tous les deux jours.

De façon intéressante, les souris traitées avec MYLS22 présentent une nette réduction de la croissance tumorale (Fig.27). Ces résultats suggèrent donc que la protéine OPA1 pourrait être une bonne cible thérapeutique candidate pour traiter le cancer du sein triple négatif.

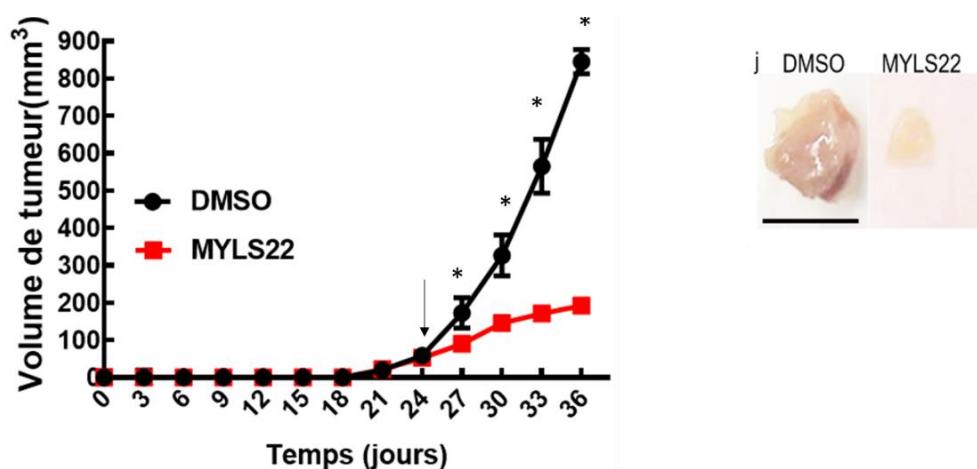


Figure 27 : Courbe de progression tumorale de tumeur du cancer du sein induite chez la souris en injectant soit du DMSO soit l'inhibiteur OPA1 MYLS22. Des tumeurs ont été induites chez des souris (n=6). La flèche représente le début du traitement. Tous les deux jours, les souris sont traitées avec l'agent pharmacologique ou le contrôle (DMSO). Après 36 jours, les souris ont été sacrifiées. La P valeur est <0,05.

4.5. Étude de l'effet de l'agent pharmacologique sur les vaisseaux sanguins

Comme montré dans la figure 27, les tumeurs extraites à partir des souris traitées avec MYLS22 présentent une coloration blanchâtre par rapport aux souris contrôles, suggérant ainsi une réduction de la vascularisation des tumeurs. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des immunofluorescences sur les coupes de tumeurs pour visualiser les vaisseaux sanguins tumoraux à l'aide de l'anticorps CD31 (Fig.28). Effectivement, le traitement au MYLS22 altère bien le diamètre des vaisseaux sanguins sans en affecter le nombre (Fig.29 et 30). En effet, comme représenté dans la figure 28, les vaisseaux sanguins des tumeurs provenant des souris traitées au MYLS22 montrent une conformation collapsée, suggérant ainsi une réduction du flux sanguin et donc une diminution de la fonctionnalité vasculaire. Ces résultats nous suggèrent que la délétion d'OPA1 dans les cellules cancéreuses empêche celles-ci à induire la vascularisation des tumeurs, qui est une étape clé pour le développement tumoral ainsi que la dissémination des métastases. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisés des expériences de co-cultures entre les MDA-MB-231 et les cellules HUVECs.

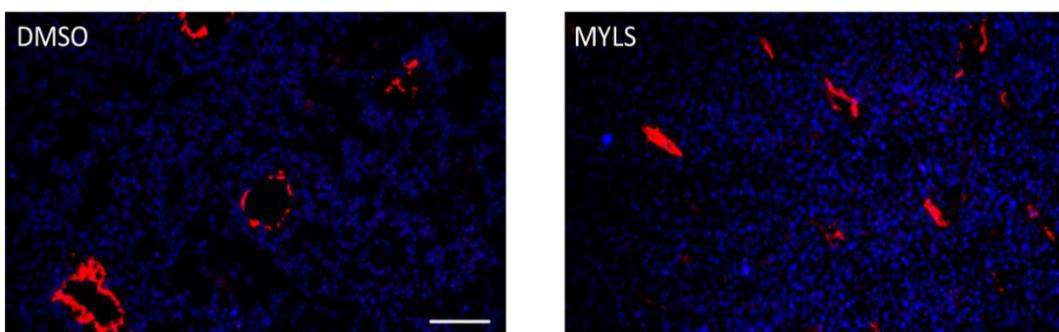


Figure 28 : Immunofluorescence sur tissu tumoral de souris traitées ou non par un agent pharmacologique. Les vaisseaux sanguins sont marqués en rouge via le marqueur de cellules endothéliales CD31 et les noyaux cellulaires en bleu grâce au DAPI.

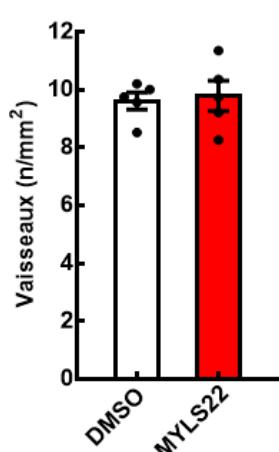


Figure 29 : Quantification du nombre de vaisseaux sanguins par mm². Chaque point représente une mesure de vaisseaux ($n=5$). La P valeur = 0,7735.

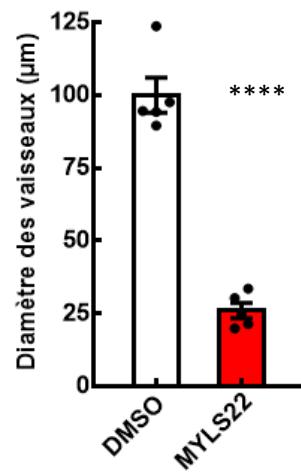


Figure 30 : Mesure du diamètre des vaisseaux sanguins (µm). Chaque point représente une mesure ($n=5$). La P valeur est <0,0001.

4.6. Étude de la prolifération des cellules HUVECs en co-culture avec des cellules MDA-MB-231 déficientes en OPA1

Afin de déterminer le potentiel des cellules MDA-MB-231 déficientes en OPA1 à stimuler la vascularisation, nous avons réalisé une expérience de co-culture indirecte entre les cellules MDA-MB-231 et les HUVECs dans le but d'évaluer la capacité proliférative des cellules endothéliales. Comme attendu, les HUVECs en co-culture avec les MDA-MB-231 WT montrent une augmentation de la prolifération par rapport aux HUVECs seules. Cependant les HUVECs en co-culture avec les cellules MDA-MB-231 OPA1^{-/-} montrent une réduction significative de leur prolifération par rapport à celles en co-cultures avec les cellules tumorales WT (Fig.31).

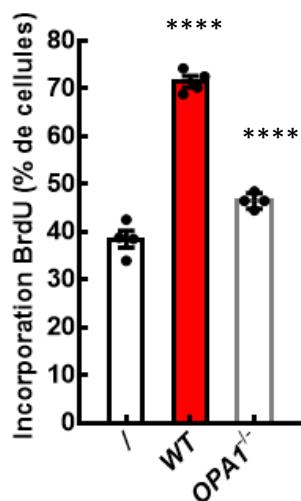


Figure 31 : Test de prolifération sur les cellules HUVECs seules ou en co-culture avec des cellules MDA-MB-231 WT ou OPA1^{-/-} pendant 24 heures. Chaque point représente une expérience indépendante ($n=4$). P valeur : WT vs OPA1^{-/-} <0,0001 ; WT vs / <0,0001.

4.7. Étude de la migration des cellules HUVECs en co-culture avec des cellules MDA-MB-231 déficientes en OPA1

Afin d'évaluer la capacité des cellules MDA-MB-231 OPA1 KO à induire la migration des cellules endothéliales, nous avons réalisé une expérience de co-culture indirecte entre les cellules MDA-MB-231 et les HUVECs. Comme attendu, les HUVECs en co-culture avec les MDA-MB-231 ont une migration accrue comparé aux HUVECs seules. De plus, les HUVECs co-cultivés avec les cellules MDA-MB-231 OPA1^{-/-} ont une migration réduite par rapport à celles co-cultivées avec les MDA-MB-231 WT (Fig.32).

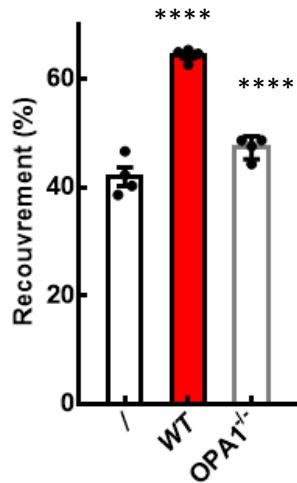


Figure 32 : Test de migration sur les cellules HUVECs seules ou en co-culture avec des cellules MDA-MB-231 WT ou $OPA1^{-/-}$. Le scratch assay a été réalisé pendant 6 heures. Chaque point représente une expérience indépendante ($n=4$). P valeur : WT vs $OPA1^{-/-}$ <0,0001 ; WT vs / <0,0001.

4.8. Étude de la prolifération des cellules HUVECs traitées avec du milieu conditionné de cellules MDA-MB-231 déficientes en OPA1

Puisque nos expériences de co-cultures indirectes entre les HUVECs et les MDA-MB-231 OPA1 KO montrent une réduction de la prolifération et de la migration des HUVECs, nous postulons qu'il doit y voir une réduction de cytokines ou de vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules cancéreuses déficientes en OPA1. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré la prolifération et la migration des HUVECs traitées avec du MC de cellules WT ou KO.

En accord avec les expériences de co-culture, les cellules endothéliales qui ont été traitées avec du milieu conditionné de cellules MDA-MB-231 $OPA1^{-/-}$ ont un taux de prolifération inférieur aux cellules qui ont été traitées en condition normale (WT) (Fig.33).

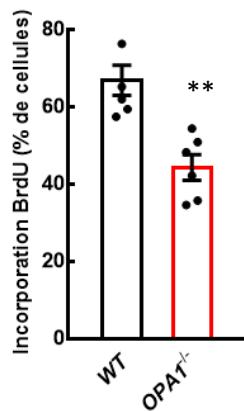


Figure 33 : Test de prolifération sur les cellules endothéliales HUVECs traitées 24 heures avant le test avec du milieu conditionné de cellules MDA-MB-231 WT ou $OPA1^{-/-}$. Chaque point représente une expérience indépendante ($n=6$). La P valeur = 0,0013.

4.9. Étude de la migration des cellules HUVECs traitées avec du milieu conditionné de cellules MDA-MB-231 déficientes en OPA1

Comme pour la prolifération, les cellules endothéliales qui ont été traitées avec le milieu conditionné de cellules KO pour OPA1 montrent une diminution de la migration significative par rapport aux cellules traitées avec le milieu des cellules WT (Fig.34).

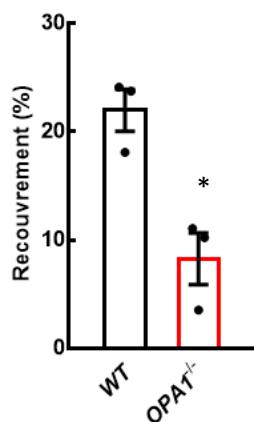


Figure 34 : Test de migration sur les cellules endothéliales HUVECs traitées 24 heures avant le test avec du milieu conditionné de cellules MDA-MB-231 WT ou OPA1^{-/-}. Chaque point représente une expérience indépendante (n=3). La P valeur = 0,0112.

4.10. Étude du niveau d'expression de différents facteurs de croissance chez les cellules déficientes en OPA1

L'ensemble de nos résultats suggère que la délétion d'OPA1 dans les cellules cancéreuses perturbe leur capacité à induire l'angiogenèse. Etant donné que le milieu conditionné des cellules tumorales montre les mêmes résultats que les co-cultures, nous postulons l'hypothèse qu'OPA1 contrôle probablement l'expression et/ou la sécrétion des facteurs de croissance tels que VEGF, FGF ou PAI-1 ou la formation et/ou sécrétion de vésicules extracellulaires, responsables de la communication entre les cellules tumorales et cellules endothéliales.

Afin de tester l'hypothèse de la régulation de l'expression des facteurs de croissance par la protéine OPA1, nous avons réalisé des expériences de RT-qPCR sur les cellules MDA-MB-231 WT et OPA^{-/-}. Nos résultats montrent que les niveaux d'expression des facteurs de croissance testés ne sont pas différents entre les cellules WT et KO (Fig.35).

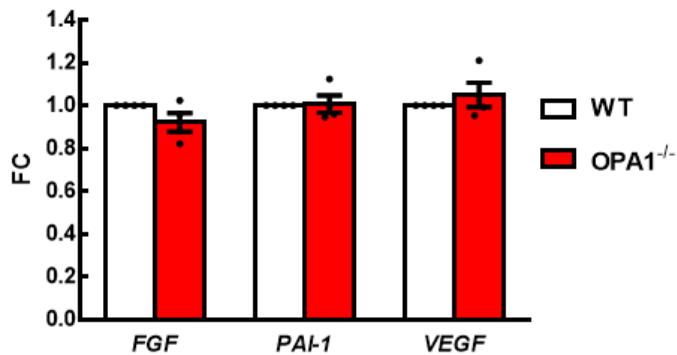


Figure 35 : RT-qPCR réalisée pour différents facteurs de croissance dans les cellules WT ou OPA1^{-/-} pour les cellules MDA-MB-231. FGF : Le facteur de croissance des fibroblastes ; PAI-1 : L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 ; VEGF : Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. Chaque point représente une expérience indépendante. P valeur : FGF = 0,1717 ; PAI-1 = 0,87 ; VEGF = 0,4393.

4.11. Étude de la biogenèse des vésicules extracellulaires CD63+

Étant donné qu'il n'y a pas de différence significative au niveau de l'expression des différents facteurs de croissance cellulaire entre les conditions WT et KO pour OPA1, nous avons testé notre seconde hypothèse selon laquelle OPA1 pourrait réguler la formation et/ou sécrétion des vésicules extracellulaires. Afin de visualiser les EVs dans les cellules tumorales WT et KO pour OPA1, nous avons réalisé des immunofluorescences de la protéine CD63 et TOM20. Le marquage TOM20 nous sert de contrôle afin de s'assurer que la morphologie des mitochondries est bien affectée à la suite de la délétion de la protéine OPA1.

Comme montré dans la figure 36, dans les MDA-MB-231, les EVs (en rouge) sont présentes aux alentours du réseau mitochondrial. Cependant, la délétion d'OPA1 entraîne une exclusion des EVs du réseau mitochondrial ainsi qu'une accumulation des EVs au sein des cellules (Fig.36).

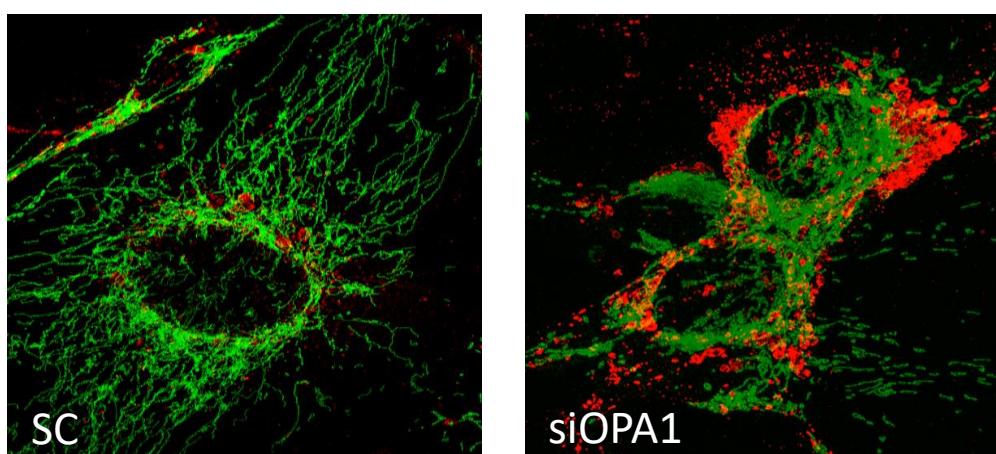


Figure 36 : Immunofluorescence sur des cellules MDA-MB-231 SC ou SiOPA1 pour TOM 20 (vert) et CD63 (rouge).

4.12. Étude de la production d'exosomes sur nos cellules déficientes en OPA1

Nos résultats précédents montrent une accumulation des EVs à l'intérieur des cellules délétées pour la protéine OPA1. Cela sous-entend soit que la délétion d'OPA1 engendre une augmentation de la biogenèse des EVs ou alors empêche la sécrétion de ceux-ci. Dans le but de voir s'il y a une augmentation de la production des EVs à la suite de la délétion d'OPA1, nous avons réalisé une extraction et une quantification du nombre de particules extracellulaires dans le milieu de culture de nos cellules déficientes pour OPA1.

Il est observé que le milieu des cellules KO a un taux de particules par millilitre plus faible que la condition contrôle (WT). Il est possible de dénombrer pas moins d'un milliard de particules par millilitre (Fig.37). Ces résultats semblent suggérer que la délétion d'OPA1 empêche la sécrétion des EVs.

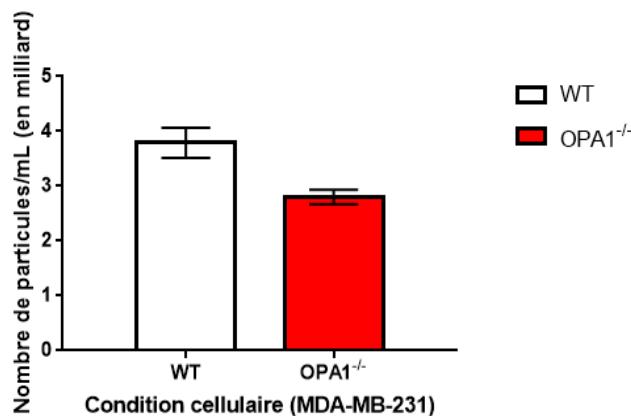


Figure 37 : Purification et quantification d'EVs dans le milieu de culture de cellules MDA-MB-231 WT ou OPA1^{-/-}.

4.13. Étude de la transmission de cellules CD63+ aux cellules endothéliales

Dans le but de comprendre si la diminution de la sécrétion des EVs des cellules MDA-MB-231 pourrait expliquer la diminution de l'activation des cellules endothéliales par les cellules tumorales, nous avons réalisés des expériences de transfert des EVs des cellules MDA-MB-231 CD63mCherry vers les HUVECs.

Les cellules MDA-MB-231 ont été modifiées afin de produire des vésicules CD63+ en rouge, ce qui permet de les tracer en microscopie confocale.

Comme montré dans la figure 38, les HUVECs en co-culture indirecte avec les cellules MDA-MB-231 déficiente pour la protéine OPA1 montrent une diminution de l'incorporation des EVs en comparaison à la condition contrôle (Fig.38).

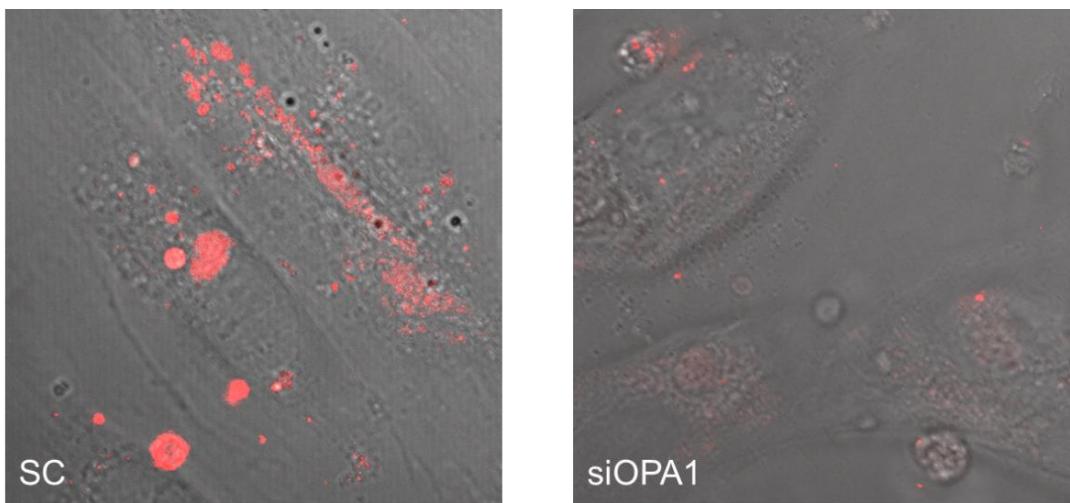


Figure 38 : Comparaison du taux d'incorporation de vésicules CD63+ des MDA-MB-231 CD63mcherry SC ou siOPA1 qui ont été co-cultivées avec les cellules endothéliales HUVECs. Les cellules ont été transfectées 72 heures avant le test. Les vésicules CD63+ sont visibles en rouge.

4.14. Étude de la prolifération des cellules HUVECs traitées avec du milieu conditionné ultracentrifugé de cellules MDA-MB-231

Finalement, afin de déterminer si cette réduction du transfert des EVs à partir des MDA-MB-231 déficientes pour la protéine OPA1 pourrait expliquer la diminution de leur capacité à induire l'angiogenèse, nous avons traités des HUVECs avec du milieu conditionné ultracentrifugé dans le but d'éliminer les EVs présentes. De façon intéressante, les HUVECs traitées avec le milieu conditionné ultracentrifugé des cellules MDA-MB-231 WT montrent une réduction de leur prolifération. De plus, le milieu conditionné ultracentrifugé ou non issu des cellules MDA-MB-231 OPA1^{-/-} ne présente pas de différence significative sur leur capacité à proliférer (Fig.39).

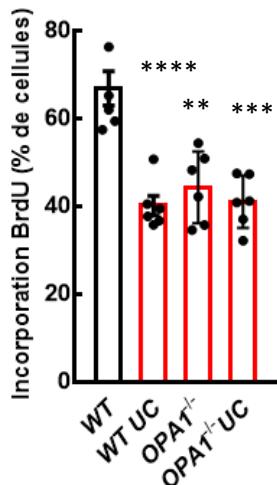


Figure 39 : Test de prolifération sur les cellules endothéliales HUVECs traitées pendant 24 heures avec du milieu conditionné de cellules MDA-MB-231 WT ou OPA1^{-/-} ultracentrifugé. Chaque point représente une expérience indépendante ($n=6$). P valeur : WT vs OPA1^{-/-} = 0,0013 ; WT vs WT UC = 0,0001 ; WT vs OPA1^{-/-} UC = 0,0002 ; OPA1^{-/-} vs OPA1^{-/-} UC = 0,4409.

4.15. Étude de la migration des cellules HUVECs traitées avec du milieu conditionné ultracentrifugé de cellules MDA-MB-231

Concernant la migration des cellules endothéliales, des résultats semblables à ceux précédemment décrit sont observables.

Les HUVECs traitées avec le milieu conditionné ultracentrifugé des cellules MDA-MB-231 WT montrent une réduction de leur migration. De plus, le milieu conditionné ultracentrifugé ou non issu des cellules MDA-MB-231 OPA1 KO ne présente pas de différences significatives sur leur capacité à migrer. Ces résultats suggèrent que les cellules MDA-MB-231 OPA1 KO induisent moins l'angiogenèse en perturbant la sécrétion des EVs (Fig.40).

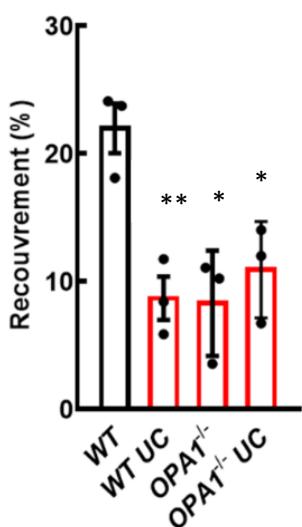


Figure 40 : Test de migration sur les cellules endothéliales HUVECs traitées pendant 24 heures avec du milieu conditionné de cellules MDA-MB-231 WT ou OPA1^{-/-} ultracentrifugé. Chaque point représente une expérience indépendante ($n=3$). P valeur : WT vs OPA1^{-/-} = 0,0112 ; WT vs WT UC = 0,0067 ; WT vs OPA1^{-/-} UC = 0,019 ; OPA1^{-/-} vs OPA1^{-/-} UC = 0,4680.

5. Discussion

Il a été démontré lors d'études antérieures que la protéine de fusion mitochondriale OPA1 est surexprimée dans un grand nombre de cancers tels que les leucémies, les cancers du sein, du colon, de l'œsophage, du poumon, des ovaires, du pancréas, des reins, de l'estomac, des testicules et de l'utérus. En effet, OPA1 est un déterminant important à prendre en considération dans les cas de cancers du sein car les femmes avec un haut taux en ARN messagers ont un pronostic vital plus faible (Zamberlan et al., 2022). Il a également été décrit que les niveaux d'OPA1 présentent une corrélation positive avec la résistance aux chimiothérapies (X. Chen et al., 2019). C'est à partir de ces mises en évidences qu'a démarré notre travail de recherche en émettant l'hypothèse qu'OPA1 joue un rôle dans le cancer du sein.

Dans ce travail, nous avons montré qu'OPA1 exécute un rôle crucial dans le développement du cancer du sein. En effet, *in vitro*, nous avons démontré que les cellules déficientes pour OPA1 ont une migration et une prolifération altérées. Ces données sont en accord avec l'étude publiée récemment, dans le laboratoire d'angiogenèse moléculaire du GIGA, selon laquelle il est également démontré que les cellules MDA-MB-231 KO pour la protéine OPA1 montrent une croissance significativement réduite par rapport aux cellules contrôles (Zamberlan et al., 2022). Toutefois, les modèles *in vitro* retirent les cellules de leur environnement de base, ce qui anéanti toutes les interactions entre les différentes cellules d'un tissu. Les cellules pourraient donc avoir tendance à se dédifférencier et dès lors se comporter différemment.

À la suite de ces résultats encourageants et des limitations du modèle *in vitro*, nous nous sommes demandé si la protéine OPA1 pourrait être une éventuelle cible thérapeutique. Pour ce faire, nous avons utilisé un inhibiteur nouvellement synthétisé (MYLS22) durant le séjour post-doctoral du Dr. Herkenne à l'Université de Padoue (Stéphanie Herkenne et al., 2020). Brièvement, cet inhibiteur est un composé chimique découvert à partir d'un screening de 12 000 composants qui inhibent l'activité GTPase de la protéine OPA1. Au niveau *in vivo*, nous montrons que lorsque nous commençons à traiter les souris ayant des tumeurs de 50 mm³, notre inhibiteur pharmacologique est capable d'inhiber la croissance des tumeurs. Ces données suggèrent qu'OPA1 serait une cible thérapeutique potentiellement intéressante pour le traitement du cancer du sein.

Contrairement aux données explorées dans la littérature montrant qu'OPA1 est un inhibiteur de l'apoptose (Frezza et al., 2006), nous avons été surpris que la délétion dans nos cellules cancéreuses mammaires n'induit pas l'apoptose (donnée non montrée dans Zamberlan et al. 2022).

De façon intéressante, nous avons remarqué que l'inhibition pharmacologique d'OPA1 dans les cellules cancéreuses inhibe également la vascularisation des tumeurs en y réduisant le diamètre des vaisseaux sanguins sans en affecter le nombre. Ces données suggèrent que la délétion d'OPA1 dans les cellules néoplasiques perturbe leur capacité à communiquer avec les cellules avoisinant les cellules tumorales. Étant donné qu'il a déjà été démontré qu'OPA1 peut réguler l'expression de gènes nucléaires (Bean et al., 2022; Stéphanie Herkenne et al., 2020) l'hypothèse suivante a été émise : les cellules MDA-MB-231, déficientes pour la protéine OPA1, expriment moins de facteur de croissances tels que FGF, VEGF ainsi que PAI-1, facteurs connus pour induire l'angiogenèse. Cependant, les niveaux d'expression de ces facteurs ne sont pas altérés à la suite d'une délétion d'OPA1.

Par après, nous nous sommes intéressés aux vésicules extracellulaires, autres acteurs importants de la communication cellulaire. Il est intéressant de noter que nous avons observé que les cellules MDA-MB-231, déficientes en OPA1, montrent une accumulation des vésicules CD63+ dans leur cytoplasme.

Les vésicules CD63+ appartiennent aux EVs, en effet, CD63 est une téraspanine faisant partie de la super-famille des protéines membranaires. On retrouve CD63 dans les endosomes tardifs ainsi que les ILVs, qui vont en étant relargués dans le milieu extracellulaire, devenir des exosomes (Pols et al., 2009). Qui plus est, ceux-ci émergent comme étant d'importants messagers dans la communication cellulaire mais aussi au sein du microenvironnement tumoral (Tian et al., 2019). L'accumulation des vésicules CD63+ au sein du cytoplasme des cellules MDA-MB-231 déficientes pour OPA1 suggèrent que soit la délétion d'OPA1 augmente la biogenèse des EVs, soit que la délétion d'OPA1 empêche leur sécrétion. Selon nos données, la délétion d'OPA1 au sein des cellules tumorales diminue la quantité d'EVs sécrétées dans le milieu ainsi que le transfert des EVs des cellules tumorales vers les cellules endothéliales.

Ce projet contient cependant certaines limitations. Nous avons par exemple réalisé des tests de migration cellulaire via la technique de *scratch assay*. Cette technique, bien que permettant une information rapide et visuelle de la migration cellulaire, mime surtout une blessure ouverte plutôt que la migration de cellules dans un tissu tumoral. Afin de confirmer ces résultats, l'évaluation de la migration cellulaire par chambre de Boyden serait plus optimale.

De plus, le traitement de cellules par milieu conditionné peut éventuellement endommager les cellules endothéliales étant donné que c'est un milieu qui a déjà été utilisé pendant 48 heures par les cellules cancéreuses. Les effets que nous observons pourraient donc être dus à l'acidification du milieu qui endommagerait les HUVECs. Une autre possibilité envisageable serait d'extraire des EVs produites par les cellules cancéreuses via un kit et de traiter les cellules endothéliales avec le produit de cette extraction d'EVs afin de vérifier que les résultats obtenus sont bien dus aux EVs et non au milieu de culture.

5.1. Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons montré qu'OPA1 est une protéine cruciale pour la croissance des cancers du sein et pourrait être une bonne cible thérapeutique pour le traitement de ce type de cancer. En perspective, il serait intéressant d'analyser l'effet de MYLS22 sur d'autres types de cancer tels que les mélanomes, le cancer du côlon ou de l'utérus, mais aussi les leucémies et le cancer du poumon qui sont des cancers avec les pronostics vitaux les plus faibles. De plus, en vue d'une utilisation en tant que traitement, des analyses pharmacologiques et toxicologiques sont nécessaires dû à l'expression ubiquitaire d'OPA1 au sein de l'organisme. Outre cela, des expérimentations chimiques afin de modifier la structure du composé sont en cours afin de rendre l'agent pharmacologique plus soluble et ainsi pouvoir administrer MYLS22 au sein de l'animal de façon différente. En effet, lors de ce travail, MYLS22 a été administré en péri-tumore dans un mélange d'éthanol et d'huile tous les deux jours. Ce type d'administration est totalement incompatible pour l'élaboration d'un nouveau traitement pour une médication humaine.

Concernant le mécanisme d'action, nos données préliminaires suggèrent que la protéine OPA1 joue un rôle dans la communication des cellules tumorales avec le microenvironnement via la sécrétion d'EVs. En perspective, il est primordial de comprendre comment une protéine de la membrane interne des mitochondries est capable de réguler la sécrétion des EVs.

Pour ce faire, des expériences de métabolomique vont être réalisées afin de déterminer quels pourraient être les métabolites responsables de ce phénotype. Dans la littérature, il a déjà été montré que le calcium ou la glutamine jouent un rôle important pour la sécrétion des EVs car ils participeraient à la courbure de la membrane plasmique, qui est une étape importante de la sécrétion cellulaire (van Niel et al., 2018). Au vu de la diversité des métabolites présents au sein des cellules, nous avons décidé de réaliser une approche non biaisée telle que la métabolomique afin d'obtenir l'ensemble des métabolites perturbés à la suite de la délétion de la protéine OPA1.

Étant donné l'importance d'OPA1 dans la fusion mitochondriale, nous souhaitons également déterminer si c'est la fonction de fusion d'OPA1 qui est responsable de ces effets sur la sécrétion des EVs ou si c'est une nouvelle fonction. À l'inverse d'OPA1, MFN1 et MFN2 ont montré qu'ils n'affectaient pas la prolifération et la migration des cellules cancéreuses du sein triple négatif, ni l'apoptose et l'angiogenèse (Stéphanie Herkenne et al., 2020; Zamberlan et al., 2022). Nous examinerons également les effets de la délétion des protéines de fusion mitochondriale MFN1 et MFN2 sur la sécrétion des EVs.

Néanmoins, durant ce travail, seules des cellules du cancer du sein MDA-MB-231 ont été utilisées. Cependant, il existe différents types de cellules de cancer du sein. Ce travail pourrait donc aussi être réalisé sur d'autres types de cellules induisant le cancer du sein comme : les cellules HS578T, MCF7 ou encore T47D. Cela permettrait de confirmer nos résultats, mais également de ne pas faire de conclusions trop hâtives concernant les résultats obtenus. En effet, à l'heure actuelle, seules les caractéristiques d'un unique type de cellules cancéreuses du sein ont été observées.

Comme perspective à long terme, le laboratoire souhaite également explorer si OPA1 joue un rôle exclusif dans la communication entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales ou si cela s'étend à d'autres communications avec les cellules du microenvironnement tumoral.

Il serait donc intéressant de réaliser d'autres expériences de co-cultures entre les cellules tumorales et les autres cellules du microenvironnement telles que les fibroblastes ou encore les cellules du système immunitaire. De plus, des marquages sur nos coupes de tumeurs issues de cellules MDA-MB-231 traitées avec l'agent pharmacologique ou non pourront également être réalisés.

Ce travail amène de belles perspectives de recherche pour le laboratoire tant au niveau de l'inhibiteur pharmacologique, MYLS22, que pour la suite de ce projet, qui va tenter de comprendre comment la protéine OPA1 diminue la sécrétion vésiculaire. De plus, il sera intéressant à l'avenir de s'interroger sur ce que contiennent ces vésicules qui amènent des messagers promouvant la progression tumorale ainsi que l'angiogenèse.

6. Bibliographie

- Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(3), 301–312. doi: 10.1007/S10571-016-0366-Z
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U. E. A., Thiselton, D. L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S. S., & Wissinger, B. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nature Genetics*, 26(2), 211–215. doi: 10.1038/79944
- Anand, R., Wai, T., Baker, M. J., Kladt, N., Schauss, A. C., Rugarli, E., & Langer, T. (2014). The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *The Journal of Cell Biology*, 204(6), 919–929. doi: 10.1083/JCB.201308006
- Baker, N., Patel, J., & Khacho, M. (2019). Linking mitochondrial dynamics, cristae remodeling and supercomplex formation: How mitochondrial structure can regulate bioenergetics. *Mitochondrion*, 49, 259–268. doi: 10.1016/J.MITO.2019.06.003
- Bean, C., Audano, M., Varanita, T., Favaretto, F., Medaglia, M., Gerdol, M., Pernas, L., Stasi, F., Giacomello, M., Herkenne, S., Muniandy, M., Heinonen, S., Cazaly, E., Ollikainen, M., Milan, G., Pallavicini, A., Pietiläinen, K. H., Vettor, R., Mitro, N., & Scorrano, L. (2022). Author Correction: The mitochondrial protein Opa1 promotes adipocyte browning that is dependent on urea cycle metabolites. *Nature Metabolism*, 4(2), 300. doi: 10.1038/S42255-022-00548-2
- Bebelman, M. P., Smit, M. J., Pegtel, D. M., & Baglio, S. R. (2018). Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, 188, 1–11. doi: 10.1016/J.PHARMTHERA.2018.02.013
- Becker, A., Thakur, B. K., Weiss, J. M., Kim, H. S., Peinado, H., & Lyden, D. (2016). Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*, 30(6), 836–848. doi: 10.1016/J.CCELL.2016.10.009
- Bertholet, A. M., Delerue, T., Millet, A. M., Moulis, M. F., David, C., Daloyau, M., Arnauné-Pelloquin, L., Davezac, N., Mils, V., Miquel, M. C., Rojo, M., & Belenguer, P. (2016). Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 90, pp. 3–19). Academic Press Inc. doi: 10.1016/j.nbd.2015.10.011
- Carafoli, E. (2003). Historical review: mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(4), 175–181. doi: 10.1016/S0968-0004(03)00053-7
- Chan, D. C. (2020). Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15, 235–259. doi: 10.1146/ANNUREV-PATHMECHDIS-012419-032711
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., & Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential

- for embryonic development. *The Journal of Cell Biology*, 160(2), 189–200. doi: 10.1083/JCB.200211046
- Chen, X., Glytsou, C., Zhou, H., Narang, S., Reyna, D. E., Lopez, A., Sakellaropoulos, T., Gong, Y., Kloetgen, A., Yap, Y. S., Wang, E., Gavathiotis, E., Tsirigos, A., Tibes, R., & Aifantis, I. (2019). Targeting Mitochondrial Structure Sensitizes Acute Myeloid Leukemia to Venetoclax Treatment. *Cancer Discovery*, 9(7), 890–909. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0117
- Cipolat, S., de Brito, O. M., Dal Zilio, B., & Scorrano, L. (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. doi: 10.1073/PNAS.0407043101
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M. E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L. C., Perales-Clemente, E., Salviati, L., Fernandez-Silva, P., Enriquez, J. A., & Scorrano, L. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*, 155(1), 160–171. doi: 10.1016/J.CELL.2013.08.032
- Corrado, M., Samardžić, D., Giacomello, M., Rana, N., Pearce, E. L., & Scorrano, L. (2021). Deletion of the mitochondria-shaping protein Opa1 during early thymocyte maturation impacts mature memory T cell metabolism. *Cell Death and Differentiation*, 28(7), 2194–2206. doi: 10.1038/s41418-021-00747-6
- de Brito, O. M., & Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456(7222), 605–610. doi: 10.1038/NATURE07534
- de Brito, O. M., & Scorrano, L. (2010). An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *The EMBO Journal*, 29(16), 2715–2723. doi: 10.1038/EMBOJ.2010.177
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), 77–106. doi: 10.1016/J.GENDIS.2018.05.001
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G. V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R. S., Danial, N. N., De Strooper, B., & Scorrano, L. (2006). OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell*, 126(1), 177–189. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.025
- Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., & Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(4), 204–224. doi: 10.1038/S41580-020-0210-7
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. doi: 10.1016/J.CELL.2011.02.013/ATTACHMENT/3F528E16-8B3C-4D8D-8DE5-43E0C98D8475/MMC1.PDF
- Herkenne, Stéphanie, Ek, O., Zamberlan, M., Pellattiero, A., Chergova, M., Chivite, I., Novotná, E., Rigoni, G., Fonseca, T. B., Samardzic, D., Agnellini, A., Bean, C., di

- Benedetto, G., Tiso, N., Argenton, F., Viola, A., Soriano, M. E., Giacomello, M., Ziviani, E., ... Scorrano, L. (2020). Developmental and Tumor Angiogenesis Requires the Mitochondria-Shaping Protein Opa1. *Cell Metabolism*, 31(5), 987-1003.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2020.04.007
- Herkenne, Stephanie, & Scorrano, L. (2020). OPA1, a new mitochondrial target in cancer therapy. *Aging*, 12(21), 20931–20933. doi: 10.18632/AGING.104207
- Hofmann, L., Ludwig, S., Vahl, J. M., Brunner, C., Hoffmann, T. K., & Theodoraki, M. N. (2020). The Emerging Role of Exosomes in Diagnosis, Prognosis, and Therapy in Head and Neck Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 4072, 21(11), 4072. doi: 10.3390/IJMS21114072
- Kasahara, A., & Scorrano, L. (2014). Mitochondria: From cell death executioners to regulators of cell differentiation. In Trends in Cell Biology (Vol. 24, Issue 12, pp. 761–770). Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.tcb.2014.08.005
- Kosaka, N., Iguchi, H., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Takeshita, F., & Ochiya, T. (2013). Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10849–10859. doi: 10.1074/JBC.M112.446831
- Kowal, J., Tkach, M., & Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29(1), 116–125. doi: 10.1016/J.CEB.2014.05.004
- Kozjak-Pavlovic, V. (2017). The MICOS complex of human mitochondria. *Cell and Tissue Research*. doi: 10.1007/s00441-016-2433-7
- Kushnareva, Y. E., Gerencser, A. A., Bossy, B., Ju, W. K., White, A. D., Waggoner, J., Ellisman, M. H., Perkins, G., & Bossy-Wetzel, E. (2013). Loss of OPA1 disturbs cellular calcium homeostasis and sensitizes for excitotoxicity. *Cell Death and Differentiation*, 20(2), 353–365. doi: 10.1038/CDD.2012.128
- Leduc-Gaudet, J. P., Hussain, S. N. A., Barreiro, E., & Gouspillou, G. (2021). Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Skeletal Muscle Health and Aging. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 8179, 22(15), 8179. doi: 10.3390/IJMS22158179
- Lee, H., & Yoon, Y. (2018). Mitochondrial membrane dynamics—functional positioning of OPA1. *Antioxidants*, 7(12). doi: 10.3390/antiox7120186
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750–2767. doi: 10.1172/JCI45014
- Lenaers, G., Reynier, P., ElAchouri, G., Soukkarieh, C., Olichon, A., Belenguer, P., Baricault, L., Ducommun, B., Hamel, C., & Delettre, C. (2009). OPA1 functions in mitochondria and dysfunctions in optic nerve. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(10), 1866–1874. doi: 10.1016/J.BIOCEL.2009.04.013
- Li, D., Wang, J., Jin, Z., & Zhang, Z. (2019). Structural and evolutionary characteristics of dynamin-related GTPase OPA1. *PeerJ*, 7(7). doi: 10.7717/PEERJ.7285

- Li, M., Wang, L., Wang, Y., Zhang, S., Zhou, G., Lieshout, R., Ma, B., Liu, J., Qu, C., Verstegen, M. M. A., Sprengers, D., Kwekkeboom, J., van der Laan, L. J. W., Cao, W., Peppelenbosch, M. P., & Pan, Q. (2020). Mitochondrial Fusion Via OPA1 and MFN1 Supports Liver Tumor Cell Metabolism and Growth. *Cells*, 9(1). doi: 10.3390/CELLS9010121
- Lima, A. R., Santos, L., Correia, M., Soares, P., Sobrinho-Simões, M., Melo, M., & Máximo, V. (2018). Dynamin-Related Protein 1 at the Crossroads of Cancer. *Genes*, 9(2). doi: 10.3390/GENES9020115
- Losón, O. C., Song, Z., Chen, H., & Chan, D. C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular Biology of the Cell*, 24(5), 659–667. doi: 10.1091/MBC.E12-10-0721
- Mavridou, D. A. I., Ferguson, S. J., & Stevens, J. M. (2013). Cytochrome c assembly. *IUBMB Life*, 65(3), 209–216. doi: 10.1002/IUB.1123
- Meyer, J. N., Leuthner, T. C., & Luz, A. L. (2017). Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology*, 391, 42–53. doi: 10.1016/j.tox.2017.07.019
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In sickness and in health. In Cell (Vol. 148, Issue 6, pp. 1145–1159). Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035
- Olichon, A., ElAchouri, G., Baricault, L., Delettre, C., Belenguer, P., & Lenaers, G. (2007). OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 14(4), 682–692. doi: 10.1038/SJ.CDD.4402048
- Olichon, Aurélien, Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., & Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 7743–7746. doi: 10.1074/JBC.C200677200
- Pernas, L., & Scorrano, L. (2015). *Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function*. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105011
- Pols, M. S., & Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research*, 315(9), 1584–1592. doi: 10.1016/J.YEXCR.2008.09.020
- Protasoni, M., & Zeviani, M. (2021). Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–55. doi: 10.3390/IJMS22020586
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. doi: 10.1083/JCB.201211138
- Ratajczak, M. Z., & Ratajczak, J. (2020). Extracellular microvesicles/exosomes: discovery, disbelief, acceptance, and the future? *Leukemia*, 34(12), 3126–3135. doi: 10.1038/S41375-020-01041-Z
- Rodrigues, T., & Ferraz, L. S. (2020). Therapeutic potential of targeting mitochondrial dynamics in cancer. *Biochemical Pharmacology*, 182. doi: 10.1016/J.BCP.2020.114282

- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., & Lombès, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 8), 1663–1674. doi: 10.1242/JCS.115.8.1663
- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S. A., Mannella, C. A., & Korsmeyer, S. J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Developmental Cell*, 2(1), 55–67. doi: 10.1016/S1534-5807(01)00116-2
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71(1), 7–33. doi: 10.3322/CAAC.21654
- Sobierajska, K., Ciszewski, W. M., Sacewicz-Hofman, I., & Niewiarowska, J. (2020). Endothelial Cells in the Tumor Microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1234, 71–86. doi: 10.1007/978-3-030-37184-5_6
- Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C., & Chan, D. C. (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *The Journal of Cell Biology*, 178(5), 749–755. doi: 10.1083/JCB.200704110
- Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J. M., Frey, T. G., Chan, D. C., & Shaw, J. M. (2009). Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 3525–3532. doi: 10.1091/mbc.E09
- Soysal, S. D., Tzankov, A., & Muenst, S. E. (2015). Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology*, 82(3–4), 142–152. doi: 10.1159/000430499
- Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2013). Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9). doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A008706
- Tian, X., Shen, H., Li, Z., Wang, T., & Wang, S. (2019). Tumor-derived exosomes, myeloid-derived suppressor cells, and tumor microenvironment. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1). doi: 10.1186/S13045-019-0772-Z
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms. In Essays in Biochemistry (Vol. 62, Issue 3, pp. 341–360). Portland Press Ltd. doi: 10.1042/EBC20170104
- Vagia, E., Mahalingam, D., & Cristofanilli, M. (2020). The Landscape of Targeted Therapies in TNBC. *Cancers 2020, Vol. 12, Page 916*, 12(4), 916. doi: 10.3390/CANCERS12040916
- van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228. doi: 10.1038/NRM.2017.125
- Wu, T., & Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Letters*, 387, 61–68. doi: 10.1016/J.CANLET.2016.01.043
- Xian, X., Håkansson, J., Ståhlberg, A., Lindblom, P., Betsholtz, C., Gerhardt, H., & Semb, H. (2006). Pericytes limit tumor cell metastasis. *The Journal of Clinical Investigation*. doi: 10.1172/JCI25705

- Yapa, N. M. B., Lisnyak, V., Reljic, B., & Ryan, M. T. (2021). Mitochondrial dynamics in health and disease. *FEBS Letters*, 595(8), 1184–1204. doi: 10.1002/1873-3468.14077
- Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research : BCR*, 22(1). doi: 10.1186/S13058-020-01296-5
- Yoon, Y. G., Koob, M. D., & Yoo, Y. H. (2010). Re-engineering the mitochondrial genomes in mammalian cells. *Anatomy & Cell Biology*, 43(2), 97. doi: 10.5115/ACB.2010.43.2.97
- Yoshida, K., & Miki, Y. (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science*, 95(11), 866–871. doi: 10.1111/J.1349-7006.2004.TB02195.X
- Zamberlan, M., Boeckx, A., Muller, F., Vinelli, F., Ek, O., Vianello, C., Coart, E., Shibata, K., Christian, A., Grespi, F., Giacomello, M., Struman, I., Scorrano, L., & Herkenne, S. (2022). Inhibition of the mitochondrial protein Opa1 curtails breast cancer growth. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 41, 95. doi: 10.1186/s13046-022-02304-6
- Zeng, A., Wang, S. R., He, Y. X., Yan, Y., & Zhang, Y. (2021). Progress in understanding of the stalk and tip cells formation involvement in angiogenesis mechanisms. *Tissue & Cell*, 73. doi: 10.1016/J.TICE.2021.101626
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience* 2019 9:1, 9(1), 1–18. doi: 10.1186/S13578-019-0282-2
- Züchner, S., Mersiyanova, I. v., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E. L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., de Jonghe, P., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M. A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A. v., ... Vance, J. M. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nature Genetics*, 36(5), 449–451. doi: 10.1038/NG1341