



HAL
open science

Identification et caractérisation d'un Cancer/Testis Antigen mitochondrial: CT55

Jade Aurriere

► **To cite this version:**

Jade Aurriere. Identification et caractérisation d'un Cancer/Testis Antigen mitochondrial: CT55. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2021. Français. NNT: 2021ANGE0033 . tel-03722167

HAL Id: tel-03722167

<https://theses.hal.science/tel-03722167>

Submitted on 13 Jul 2022

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Discipline : *Biologie cellulaire (CNU65)*

Spécialité : *Biologie cellulaire, biologie du développement*

Par

Jade AURRIERE

**Identification et caractérisation d'un *Cancer/Testis Antigen*
mitochondrial : CT55**

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 29 Janvier 2021

Unité de recherche : Laboratoire MitoVasc – Equipe Mitolab – UMR CNRS 6015, INSERM U1083

Rapporteurs avant soutenance :

Anna Campalans Chercheur CEA, CEA, Paris Saclay
Rodrigue Rossignol DR2, U1211, MRGM, Bordeaux

Composition du Jury :

Examineurs : Jennifer Rieusset DR2, INSERM U1060, INRA 1397, CarMeN, Lyon
Pascale May-Panloup PUPH, INSERM U1083, CNRS 6015, MITOVASC, Angers

Dir. de thèse : Guy Lenaers DR1, INSERM U1083, CNRS 6015, MITOVASC, Angers
Co-dir. de thèse : Salim Khiati MCF, INSERM U1083, CNRS 6015, MITOVASC, Angers

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier l'ensemble des **membres de mon jury de thèse** : Mme Anna Campalans, Mr Rodrigue Rossignol, Mme Jennifer Rieusset et Mme Pascale May-Panloup pour le temps accordé à la lecture et l'évaluation de ce manuscrit.

J'aimerais ensuite remercier mes directeurs de thèse. J'ai beaucoup appris pendant ces années, notamment grâce à la complémentarité de votre encadrement :

Salim, merci pour m'avoir permis de réaliser cette thèse il y a trois ans. Merci aussi de m'avoir accompagnée et soutenue tout autant pour le projet en lui-même que pour les activités annexes telles que le monitorat ou l'association de doctorants qui m'ont beaucoup apporté. Merci aussi de m'avoir encouragée à sortir de ma zone de confort et permise de partir à l'étranger. Toutes ces expériences ont été très enrichissantes pour moi et je t'en remercie sincèrement.

Guy, je te remercie également pour ton accompagnement tout au long de cette thèse. Tu as su être présent et nous canaliser quand il le fallait, toujours avec bienveillance. Merci aussi pour ton implication et ton appui notamment en cette fin de thèse et ce, malgré les responsabilités qui t'incombent.

Je voudrais remercier le **SCIAM** et notamment **Rodolphe** et **Florence** pour les longues heures passées à la microscopie confocale et électronique.

Je tiens à remercier **Yves Pommier** pour son accueil au laboratoire de pharmacologie du NIH. Un grand merci aussi à **Naomi** et **Carson** mais aussi **Simone** et **Brunilde** et tous les membres du laboratoire pour avoir rendu cette mobilité mémorable professionnellement et personnellement.

Je voudrais ensuite remercier tous les membres de **l'équipe MitoLab** :

Au trio « de choc » : **Magalie, Florian et Jérémy**, merci aussi bien pour l'entraide pour les manips que pour les pauses goûter de l'après-midi. A toutes les histoires qui resteront mythiques entre Bernard et Lisa, « Ah Paris », BFM, l'épicé, les répliques de film, pour ne citer qu'elles et les post-it pour ne rien oublier. Sans vous ça n'aurait pas été pareil. Je vous souhaite le meilleur pour la suite, car oui, c'est vous les prochains !

Aurélie, merci pour tout ce que tu fais pour l'équipe, de toujours prendre le temps de nous écouter et de rythmer la vie du labo. Un grand merci aussi, car tu as été là depuis le début et présente à chaque coup de moins bien.

A **Nancy**, on a commencé et on terminera *-presque-* ensemble. Il y a « ce lien » comme tu disais, c'est sûr ! En tout cas, merci pour ton dynamisme, ton enthousiasme et ton organisation à toute épreuve (qui m'a sauvée plus d'une fois) ! Merci aussi car avec les autres jeunes mamans : **Morgane, Sophie et Cinzia**

on ne pourra pas dire qu'on ne savait pas, vous ne nous avez épargné aucun détail... vraiment aucun ! Et professionnellement, merci aussi car vous avez toujours su être de très bons conseils fort utiles.

David et Yannick, un grand merci pour vos précieux conseils et votre aide pour les manip ou les analyses. Merci à **Alexia, Charlotte et Charlène** de partager le bureau et d'y apporter la fraîcheur d'un début de thèse. Courage pour la suite ! A **Anaïs, Steph** et **Caroline** pendant le sport ou en dehors, les discussions ont dépassé le cadre du travail et je vous remercie pour ces moments.

Je tiens à remercier **Arnaud** pour m'avoir guidée vers le monitorat et **Olivier** pour son appui indispensable sur les papiers, son écoute et son soutien toujours au rendez-vous. Pour les pauses musicales aussi, évidemment !

A ceux qui sont passés par cette équipe : **Alexis, Jean-Baptiste, Paul, Rodrigo, Zouhair, Ghita, Aymane, Apolline et Cécile**, que ce soit pour quelques semaines ou quelques mois, merci pour tous les bons moments qui ont ponctué cette thèse.

Aurore, Selma et Jenny, même si vous êtes parties, je tiens à vous remercier d'avoir été présentes lors du début de la thèse et tenté *-en vain ?-* de m'endurcir pour pouvoir affronter les contretemps de ces trois ans.

Un merci également à **Philippe, Majida, Valérie, Naïg, Catherine** et **Carole** et à tous les membres de l'équipe que j'aurais pu omettre. Mitolab est, comme on le dit souvent, une grande famille dont on ne se sépare jamais complètement.

Je voudrais aussi remercier **l'équipe CarMe** dans laquelle tout a commencé en Master :

Daniel, merci beaucoup de m'avoir donné l'envie de continuer en thèse et toujours soutenue pendant et après le stage, je vous dois beaucoup. Je voudrais aussi remercier **Anne-Laure, Emilie, Linda et Claire**. Physiquement plus loin, merci pour tout ce que vous m'avez appris, votre bienveillance et votre disponibilité sans faille. **Joohee, Coralyne** – et j'inclue là aussi **Lily et Aurélien** – on a commencé ensemble et on s'est toujours suivis depuis, même à distance. Un grand merci à **Louis** aussi pour les discussions de tout et n'importe quoi, souvent tardives autour d'un verre (quand c'était encore possible) et les nombreuses autres à venir, sans faute !

Comment ne pas évoquer ALPhA ? **Jérémy, Mélanie et Joohee**, on s'est battus pour que l'association soit mise en place et perdure et je suis fière d'avoir partagé cette aventure avec vous. Pour le Gala, c'est trop tard, mais j'attends le Karaoké !

Aux copains de Licence : **Lucile et Guillaume, Etienne et Pauline, Louis et Constance, Vincent, Maxime et Francesca, Corentin**, presque 10 ans après notre rencontre en L1, vous êtes toujours là. Nos vies évoluent mais chaque fois qu'on se retrouve, on a encore 20 ans ensemble et rien ne change. Avec vous, je suis un peu – *littéralement* – en famille. Et si on se donnait rendez-vous dans 10 ans ?

A **ma famille**, merci de m'avoir toujours portée et accompagnée toutes ces années malgré le caractère que je vous impose souvent...Je n'y serai pas parvenue sans vous. A **Maman**, j'espère te prouver maintenant que tu as eu raison d'insister quand j'étais petite. A **Papa** et nos débats animés tard le soir sur la génétique. A **ma sœur, Nicolas et Raphaël**, on se soutient pour de vrai. On ne se dit pas souvent qu'on s'aime nous mais on le sait. C'est dans les gènes.

A **mes grands-parents**, merci de nous guider toujours, hier aujourd'hui et demain, dans nos vies. Il ne sera jamais possible de vous rendre tout ce que vous nous avez apporté. **Mamie**, je ne l'ai jamais dit mais l'injustice de ta maladie a été un moteur de mon orientation. Je n'oublie pas non plus ceux qui sont partis. **Manou**, les années passent mais ton souvenir jamais ne s'éteint. **Tonton**, car l'injustice a encore frappé, le souvenir de ta gentillesse et ta générosité doit nous pousser vers l'avant. Et parce que la médecine n'a pas eu de réponse, la science doit continuer de poser les questions.

A **Lila, Peug** et toute la **famille Champin-Aoudj**, merci d'être présents et de toujours nous soutenir, avec Tristan. Et même si ce ne sera officiel que dans quelques temps, pour moi, on fait déjà partie de la même famille.

A **Tristan**, merci d'avoir toujours su être là dans les bons comme les moments difficiles que nous avons traversés – récemment plus encore... Et sans compter le stress de ces derniers mois ! Chaque jour, *La Team* se renforce un peu plus. J'ai toujours peur du dimanche soir ... mais parce que c'est toi, rien de ce que la vie pourra mettre sur notre chemin ne m'effraie, on sera prêts. Ensemble.

Abréviations

$\Delta\psi_m$	Potentiel de membrane mitochondrial
aa	Acides Aminés
ADNmt	Acide DéoxyriboNucléique mitochondrial
ADNn	Acide Déoxyribonucléique nucléaire
ADP	Adénosine Di-Phosphate
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARNr	Acide Déoxyribonucléique ribosomique
ARNt	Acide Ribonucléique de Transfert
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BER	<i>Base Excision Repair</i>
CAC	<i>Colotis Associated Cancer</i>
CBS	<i>Conserved Sequence Blocks</i>
CCLÉ	Cancer Cell Line Encyclopedia
CMT2A	Charcot-Marie-Tooth type 2A
CRC	<i>Colorectal Cancer</i>
CTA	<i>Cancer/Testis Antigen</i>
CYP2B1	Cytochrome P450 2B1
DAG	DiAcyl-Glycerol
DGAT	<i>DiacylGlycerol AcylTransferase</i>
dGK	<i>deoxyGuanosine Kinase</i>
dNTP	déoxyriboNucléoside TriPhosphate
DRP1	<i>Dynamin Related Protein 1</i>
EB1	Microtubule plus-End Binding protein
ERGIC	<i>ER-Golgi Intermediate Compartment</i>
ERMES	<i>ER-Mitochondria Encounter Structure</i>
ETC	Chaîne de Transport des Électrons
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide
GIP	<i>General Import Pore</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
HSP	<i>Heavy Strand Promoter</i>
HSP70	<i>Heat Shock Protein 70</i>
IFN2	<i>Inverted Formin 2</i>
IKK	<i>Inhibitory NF-κB Kinase</i>
IP ₃	Inositol 1,4,5-triPhosphate
IP ₃ R	<i>Inositol 1,4,5 tris-Phosphate Receptor</i>
kDa	kiloDalton
KIF5B	<i>Kinesin-1 heavy chain</i>

KO	<i>Knock-Out</i>
LECA	<i>Last Eukaryote Common Ancestor</i>
LpSOD	la superoxyde dismutase contenant du fer
LSP	<i>Light Strand Promoter</i>
MAM	<i>Mitochondrial Associated Membranes</i>
MCS	<i>Membrane Contact Site</i>
MCU	<i>Mitochondrial Calcium Uniporter</i>
MFN1/2	Mitofusin 1/2
MFF	<i>Mitochondrial Fission Factor</i>
MIA	<i>Mitochondrial intermembrane space Import and Assembly</i>
MICOS	<i>Mitochondrial Contact site and cristae Organizing System</i>
MiD	Mitochondrial Dynamics protein
MME	Membrane Mitochondriale Externe
MMI	Membrane Mitochondriale Interne
MPP	<i>Mitochondrial Processing Peptidase</i>
mPTP	<i>Permeability Transition Pore mitochondrial</i>
MTS	<i>Mitochondrial Targeting Sequence</i>
mtSSB	<i>Single-Stranded DNA-Binding protein</i>
NAC	Naissant polypeptide associated Complex
NADH	Nicotinamide adénine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NCI	<i>National Cancer Institut</i>
NDPK	<i>deoxyriboNucleoside DiPhosphate Kinase</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-Kappa B</i>
NLRP3	<i>NOD-Like Receptor Protein 3</i>
NMPK	<i>deoxyriboNucleoside MonoPhosphate Kinase</i>
O ₂	DiOxygène
O _H	Origine de répliation du brin lourd (<i>H - Heavy</i>)
O _L	Origine de répliation du brin léger (<i>L - Light</i>)
OPA1	<i>Optic Atrophy protein 1</i>
OXA1	<i>Oxidase assembly 1-like protein</i>
OXPHOS	Phosphorylation Oxydative
PA	Acide Phosphatidique
PAM	<i>Presequence translocase-Associated Motor</i>
pb	paires de bases
PC	PhosphatidylCholine
PE	PhosphatidylEthanolamine
PEMT	<i>PhosphatidylEthanolamine-N-MethylTransferase-2</i>

PGC1a	<i>PPAR gamma co-activator 1</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PLC	Phospholipase C
POLG	ADN Polymerase Gamma
POLRMT	<i>RNA Polymerase Mitochondrial</i>
PS	<i>PhosphatidylSerine</i>
RCPG	Récepteur Couplé à une Protéine G
RE	Réticulum Endoplasmique
REL	Réticulum Endoplasmique Lisse
RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux
RITOLS	<i>RNA Incorporated ThroughOut the Lagging Strand</i>
RNC	Ribosome-Nascent chain Complex
ROS	Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)
RyR	Récepteur à la Ryanodine
SA	<i>Signal Anchor</i>
SAM	<i>Sorting and Assembly Machinery</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOCE	<i>Store-Operated Ca²⁺ Entry</i>
SP	<i>Signal Peptide</i>
SPC	<i>Signal Peptidase Complex</i>
SRP	<i>Signal Recognition Protein</i>
STIM1	<i>Stromal Interaction Molecule 1</i>
TAC	<i>Tip Attachment Complex</i>
TFAM	<i>Transcription Factor A, mitochondrial</i>
TIM	<i>Translocase Inner Membrane</i>
TK1/2	Thymidine Kinase 1/2
TNFa	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TOM	<i>Translocase of Outer Mitochondrial Membrane</i>
VADS	Voies AéroDigestives Supérieures
VDAC	<i>Voltage Dependent Anion Channel</i>
WT	<i>Wild Type</i>

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
1. Généralités sur la mitochondrie.....	2
1.1. Origine et structure.....	2
1.2. Dynamique mitochondriale.....	4
1.2.1. Les mécanismes de fusion et de fusion.....	5
1.2.2. Dysfonctions et pathologies liées à la dynamique mitochondriale.....	6
1.3. Métabolisme énergétique.....	7
1.3.1. La glycolyse.....	7
1.3.2. La β -oxydation des acides gras.....	7
1.3.3. Le cycle de Krebs.....	8
1.3.4. La phosphorylation oxydative.....	8
2. ADN mitochondrial.....	10
2.1. Structure.....	10
2.1.1. Les spécificités de l'ADNmt par rapport à l'ADN nucléaire.....	10
2.1.2. Organisation de l'ADNmt.....	10
2.1.3. Structure et distribution des nucléoïdes.....	11
2.2. Réplication et transcription.....	12
2.2.1. Mécanisme de réplication du génome mitochondrial.....	12
2.2.2. Les modèles de réplication et de compaction de l'ADNmt.....	13
2.3. Importance de la quantité d'ADNmt.....	14
2.3.1. Corrélation avec l'expression des protéines de réplication (Modèles murins de défaut de réplication du génome mitochondrial).....	14
2.3.2. Le pool de dNTP mitochondriaux.....	15
2.3.3. Rôle des contacts entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique.....	16
2.3.4. Défauts de l'ADNmt.....	17
3. Le réticulum endoplasmique.....	19
3.1. Structure.....	19
3.2. Fonctions.....	20
3.2.1. La synthèse et le repliement des protéines.....	20
3.2.2. La biogenèse lipidique.....	20
3.2.3. Le métabolisme du calcium (Ca^{2+}).....	21
3.3. Les MAM (Mitochondrial Associated Membranes).....	21
3.3.1. Définition et découverte.....	21
3.3.2. Structure et composition.....	22
3.3.3. Fonctions des MAM.....	23
a) La biosynthèse lipidique.....	23
b) La dynamique mitochondriale.....	23
c) Le transport de calcium.....	24
4. Mécanismes d'import vers la mitochondrie et le RE.....	26
4.1. Import vers la mitochondrie.....	26
4.1.1. Les signaux d'adressage mitochondrial.....	26
4.1.2. Les mécanismes d'import mitochondrial.....	27
4.2. Import vers le réticulum endoplasmique.....	29
4.2.1. Les signaux d'adressage au réticulum endoplasmique.....	30
4.2.2. Translocation co-traductionnelle vers le RE.....	30
4.2.3. Translocation post-traductionnelle vers le RE.....	31
4.2.4. Exemples de double-adressage des protéines vers la mitochondrie et le RE.....	32

5.	Identification de CT55 : un nouveau régulateur de l'ADNmt ?	34
6.	CT55 : un membre de la famille des Cancer/Testis Antigens (CTA)	36
6.1.	Les CTA.....	36
6.1.1.	Les CTA : des cibles de choix pour l'immunothérapie	36
6.1.2.	Relation entre les CTA et la mitochondrie	45
6.2.	CT55.....	55
6.2.1.	Expression dans les tissus cancéreux.....	55
6.2.2.	Fonction cellulaire ?	56
RESULTATS.....	59
1.	CT55 régule le nombre de copies d'ADN mitochondrial et maintient la prolifération cellulaire	60
1.1.	Introduction	60
1.2.	Résultats et discussion	83
1.2.1.	CT55 présente une localisation ambiguë à la mitochondrie et au réticulum endoplasmique.....	83
1.2.2.	L'expression de CT55 est positivement corrélée avec le nombre de copies d'ADNmt	83
1.2.3.	Une diminution de CT55 est associée à une inhibition de la prolifération	85
1.3.	Conclusion et perspectives	86
2.	Résultats et données complémentaires	87
2.1.	Analyse de la séquence protéique de CT55	87
2.1.1.	Domaines identifiés et prédictifs	87
2.1.2.	Similarité avec l'hélicase MOV10L.....	88
2.2.	Interactome de CT55 : identification de partenaires du RE, des mitochondries et des vésicules du complexe SNARE.....	89
2.3.	Expression physiologique de CT55.....	90
2.4.	Conclusion et Discussion	92
2.4.1.	Expression et localisation cellulaire de CT55 en physiologie	92
2.4.2.	CT55, impliqué dans la régulation de l'ADNmt <i>via</i> les MAM.	93
2.4.3.	CT55 pourrait être impliqué dans la régulation des piRNA.	93
CONCLUSION GENERALE	95
FICHES TECHNIQUES.....	97
	Fiche Technique n°1 : Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées.....	98
	Fiche Technique n°2 : Culture cellulaire et transfection des siRNA	100
	Fiche Technique n°3 : Évaluation de la viabilité cellulaire (IncuCyte, Crystal Violet et ATP Lite)	101
	Fiche Technique n°4 : Dosage de protéines et Western Blot	102
	Fiche Technique n°5 : Extraction d'ADN et quantification de l'ADNmt.....	104
	Fiche Technique n°6 : Extraction d'ARN et RT-qPCR	105
	Fiche Technique n°7 : Microscopie à fluorescence (live et immunofixation)	106
	Fiche Technique n°8 : Immunofixation sur lames de tissus paraffinées.....	108
	Fiche Technique n°9 : Immunoprécipitation	110
TABLE DES ILLUSTRATIONS	111
AUTRES ACTIVITES	113
Publications	113
Communications.....	113
Enseignement	113
BIBLIOGRAPHIE.....	115

Introduction

1. Généralités sur la mitochondrie

En 1898, le terme de « mitochondrie » est utilisé pour la première fois pour désigner des structures cellulaires ubiquitaires selon leur forme qualifiée littéralement de filamenteuse (mitos) et granulaire (chondros) (Benda, 1898). La mitochondrie est en effet un organite clef présent au sein de toutes les cellules eucaryotes, excepté les globules rouges, dont la morphologie est liée à ses fonctions. Chaque cellule humaine en contient en moyenne plusieurs centaines même si leur nombre varie suivant les besoins énergétiques des tissus. La mitochondrie est, à ce titre, considérée comme un carrefour de multiples voies métaboliques. En effet, sa fonction première est de générer l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des cellules et ce, sous une forme utilisable : l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate). Cette action est rendue possible grâce au processus de phosphorylation oxydative (OXPHOS) de la chaîne de transport des électrons (ETC). Bien qu'il s'agisse de la fonction la plus décrite, la mitochondrie est aussi le siège de bien d'autres fonctions impliquées dans la survie cellulaire, l'apoptose, la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO – ROS Reactive Oxygen species), le transfert de calcium, la synthèse des hormones stéroïdes ou la β -oxydation des acides gras, entre autres. Son origine bactérienne, dont son propre ADN n'est autre que le vestige, distingue aussi la mitochondrie de tout autre organite présent dans la cellule.

1.1. Origine et structure

En 1970, Lynn Margulis a publié un livre nommé « Origine des cellules eucaryotes » dans lequel était déjà évoquée l'origine endosymbiotique des mitochondries à partir de bactéries ancestrales (Margulis, 1970). Par la suite, deux modèles hypothétiques généraux ont été établis : d'une part, le « *symbiogenesis scenario* » et d'autre part le « *archezoan scenario* ». Dans les deux cas, il est question d'une symbiose entre une α -proteobactérie et un hôte primitif. La principale différence entre les deux scénarios est que dans le premier – *symbiogenesis* –, l'hôte est un procaryote et la symbiose a permis la formation de mitochondries puis de son noyau et sa compartimentalisation conduisant à la cellule eucaryote ancestrale, tandis que dans le deuxième – *archezoan* –, il existait déjà une cellule eucaryote formée mais sans mitochondrie lorsque la symbiose a eu lieu. Les études protéomiques et phylogénétiques se rejoignent aujourd'hui sur l'idée que les voies de signalisation, les protéines et les fonctions mitochondriales ont émergé dans une lignée eucaryote suite à une endosymbiose avec une α -proteobactérie, dans le sens du second scénario (Gray, 2012). Certains points de l'origine des cellules ont longtemps été débattus comme la nature de l'hôte, le mécanisme d'acquisition mitochondriale ou la chronologie de cette acquisition lors du développement des cellules eucaryotes. Il apparaît aujourd'hui communément admis, avec les données disponibles, que la phagocytose est le mécanisme privilégié pour l'acquisition mitochondriale conduisant à un ancêtre eucaryote nommé LECA (*Last Eukaryotic Common Ancestor*) (Poole and Gribaldo, 2014; Roger et al., 2017).

Concernant sa structure, la mitochondrie est un organite intracellulaire qui possède une double membrane caractéristique (Fig.1). Les membranes mitochondriales interne (MMI) et externe (MME) présentent des compositions protéiques et lipidiques hétérogènes en correspondance avec des fonctions bien distinctes, et

permettent de délimiter deux espaces : l'espace intermembranaire et la matrice. La MME présente une composition proche de la membrane plasmique. Elle est lisse et perméable aux solutés, et contient pour ce faire une grande quantité de porines permettant le passage de petites molécules inférieures à 5 kDa (Mannella, 1992). La MMI est plus imperméable, riche en protéines et pauvre en phospholipides. Le passage des molécules par la MME est rendu possible grâce à des transporteurs, des navettes ou des translocases pour permettre l'échange de métabolites et d'ions ainsi que l'import de nucléotides, d'acides aminés et de protéines. Parmi ces translocases, les complexes TOM et OXA1 sont responsables de l'import des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire et notamment la majorité des sous-unités de la chaîne respiratoire (Neupert et Hermann 2007). La MMI forme des replis afin d'augmenter sa surface : ce sont les crêtes mitochondriales. Ces crêtes portent la chaîne respiratoire, composée de cinq complexes qui génèrent l'ATP grâce à la phosphorylation oxydative (OXPHOS) (El-Hattab et al., 2017). L'espace intermembranaire possède une composition proche du cytosol du fait de la perméabilité de la MME. Au contraire, la matrice en est isolée parce qu'elle est délimitée par la membrane interne. Elle contient les multiples copies de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ainsi que les enzymes, ARN de transfert (ARNt) et ribosomiques (ARNr) nécessaires à l'expression du génome mitochondrial. La matrice est également le siège de la synthèse d'ATP, du cycle de Krebs et de l'oxydation des acides gras.

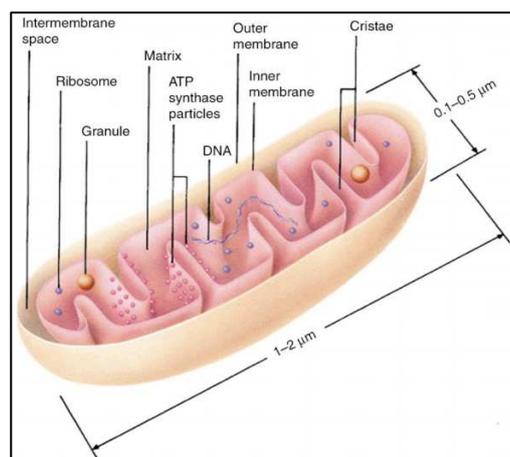


Figure 1: Schéma représentant la structure interne de la mitochondrie, ses membranes, ses compartiments et les principaux éléments la composant (Frey and Mannella, 2000).

La structure interne de la mitochondrie n'est pourtant pas figée et peut être modifiée en fonction des besoins énergétiques de la cellule. Bien que, dans la plupart des cellules, les mitochondries sont souvent présentes dans une conformation structurelle dite « orthodoxe », la membrane mitochondriale interne est dynamique, induisant plus de deux états morphologiques (Fig.2). La conformation « orthodoxe » est caractérisée par une matrice avec un volume important et un espace intermembranaire assez faible. Au contraire, l'état « condensé » possède une matrice dense et des crêtes plus larges avec une membrane interne repoussée loin de la membrane externe. Ainsi, l'espace matriciel et la membrane interne peuvent se contracter selon l'état métabolique ou osmotique. Il existe un troisième état, dit « intermédiaire », entre les états décrits précédemment. Ces conformations sont réversibles et strictement corrélées au statut métabolique de la mitochondrie. L'hypothèse a d'abord été que la forme condensée de la mitochondrie était plus efficace. Elle est désormais décrite comme due à un excès d'ADP, alors que la conformation orthodoxe serait liée à une faible concentration d'ADP dans l'environnement (Mannella,

2006, 2008). La mitochondrie est ainsi capable de modifier sa structure interne mais également de fusionner ou fissionner ses membranes externe et interne, lui conférant un aspect dynamique au sein de la cellule.

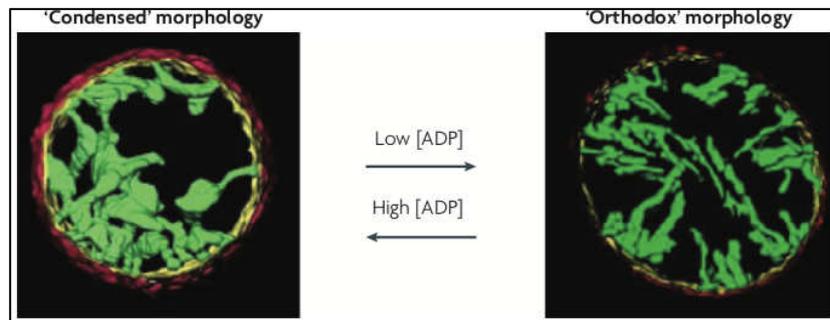


Figure 2: Représentation de microscopie électronique de mitochondries dans deux conformations structurelles différentes. A gauche, la morphologie condensée est caractérisée par des crêtes larges tandis qu'à droite, la morphologie orthodoxe correspond à des crêtes moins larges et moins de contacts entre les crêtes. Ces états sont dépendants de la concentration d'ADP dans l'environnement. En vert : les membranes de crêtes ; en rouge : la membrane externe ; en jaune : la limite de membrane interne. Adapté de (Detmer and Chan, 2007).

1.2. Dynamique mitochondriale

Loin du concept d'organe statique, la mitochondrie a été, grâce à la microscopie, décrite comme une structure dynamique dès les années 1990 (Bereiter-Hahn, 1990) (Fig.3). Elle est en effet capable de modifier ses membranes interne et externe pour s'adapter aux besoins de la cellule, un processus qualifié de dynamique mitochondriale. Ainsi, les mitochondries sont considérées comme un vaste réseau et non comme de multiples organites isolés. Ce mécanisme repose sur un équilibre entre la fission et la fusion afin de répondre à la demande énergétique et à l'élimination des mitochondries endommagées. Cet équilibre permet de contrôler la distribution des mitochondries au sein du cytoplasme, et de moduler son métabolisme et la maintenance du génome mitochondrial. Lors d'un réseau mitochondrial trop connecté, une fission se met en place, en général en réponse à un stress, aboutissant à une diminution du potentiel de membrane et donc à une réduction de la phosphorylation oxydative, associée à une baisse de consommation d'O₂ et de la production d'ATP. *A contrario*, la fusion est augmentée si une diminution du nombre de mitochondries mobiles est nécessaire, aboutissant à une augmentation du potentiel de membrane et donc à une augmentation de la phosphorylation oxydative.

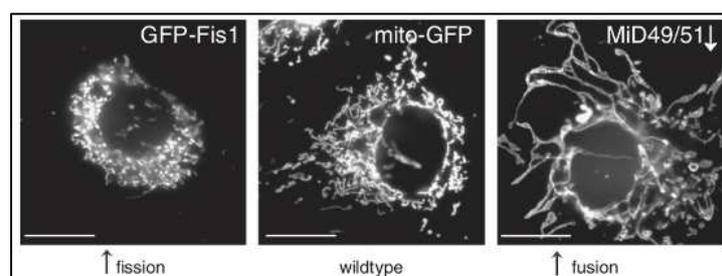


Figure 3: La dynamique mitochondriale est corrélée à la morphologie de l'organite. A gauche, la surexpression de GFP-Fis1 induit la fragmentation du réseau mitochondrial dans des cellules COS7. Au centre, les cellules COS7 sont transfectées avec

une GFP ciblée à la matrice mitochondriale. *A droite*, la perte de MiD49/51 (pro-fission) déséquilibre la dynamique et induit un réseau hyper connecté. Mise en évidence du réseau mitochondrial par une GFP-matricielle (Palmer et al., 2011).

1.2.1. Les mécanismes de fusion et de fission

La fission mène à la fragmentation mitochondriale (Fig.4). Elle est principalement contrôlée par la dynamine DRP1 (Dynamamin-Related Protéine 1) et des protéines de la membrane externe mitochondriale Fis1, MFF, MID49 et MID51. DRP1 est une protéine cytosolique qui, en réponse à des signaux cellulaires, est recrutée au niveau de sites de division mitochondriale dont la détermination pose encore question. Récemment, il a été montré que le réticulum endoplasmique pourrait jouer un rôle dans cette première étape qui permet un pré-rétrécissement des membranes au niveau de ces sites (Friedman et al., 2011). DRP1 entre alors en contact avec la mitochondrie, se fixe sur Fis1 et s'oligodimérise de façon GTP-dépendante formant des hélices permettant la constriction des membranes externes. Trois autres protéines pourraient servir de récepteurs à DRP1 : MFF (Mitochondrial Fission Factor), MiD49 et MiD51 (Mitochondrial Dynamics protein 49 & 51). L'hydrolyse du GTP procure la force mécano-chimique qui complète la fission des membranes externe et interne et des modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitylation ou la phosphorylation peuvent affecter le recrutement ou la fonction de DRP1. Les cellules délétées pour DRP1 présentent ainsi un réseau hypertubulaire. D'autres protéines que DRP1 pourraient aussi jouer un rôle dans la fission et notamment de la membrane interne : S-OPA1 et MTP18. S-OPA1 est générée à partir du clivage de L-OPA1 et se trouve colocalisée avec DRP1 au niveau des sites de contact avec le réticulum endoplasmique (Anand et al., 2014). De même, la délétion de MTP18 induit une hyperconnexion du réseau mitochondrial et à l'inverse, une surexpression permet une fragmentation de ce réseau (Tondera et al., 2004).

La fusion mitochondriale, quant à elle, conduit à un réseau tubulaire interconnecté, impliquant les fusions respectives des MME et MMI (Fig.4). Elle est médiée par l'action de trois GTPases : MFN 1 et MFN2 (*Mitofusin 1 ; 2*) situées sur la MME, et OPA1 (*Optic Atrophy 1*) sur la MMI. Les protéines MFN1/2 contiennent un domaine de liaison au GTP à leur extrémité N-terminale et sont ancrées à la MME par un domaine transmembranaire en C-terminal. Elles permettent la fusion des MME par des liaisons homodimériques ou hétérodimériques dépendantes de l'hydrolyse du GTP. OPA1 est une GTPase ancrée sur la MMI grâce à un domaine transmembranaire localisé en N-terminal. Grâce à des épissages alternatifs et des clivages protéolytiques, OPA1 existe sous plusieurs formes : des formes longues (L-OPA1) et des formes courtes (S-OPA1). Le clivage de L-OPA1 et l'accumulation de S-OPA1 sont responsables d'une fragmentation mitochondriale (Ishihara et al., 2006). En plus de sa fonction dans la régulation de la dynamique mitochondriale, OPA1 permet de réguler le remodelage des crêtes, la maintenance de l'ADNmt, ou le relargage du cytochrome C induisant l'apoptose cellulaire (Elachouri et al., 2011; Olichon et al., 2003, 2007).

D'autres protéines semblent impliquées dans les mécanismes de dynamique mitochondriale, comme la mitoPLD, une phospholipase de la MME dont la délétion provoque une fragmentation mitochondriale (Huang et al., 2011), pointant vers un rôle des lipides dans la dynamique de ces membranes. L'équilibre fusion-fission mitochondriale

permet de préserver l'intégrité du génome mitochondrial tout en déterminant la morphologie de l'organe, expliquant la nécessité de sa régulation.

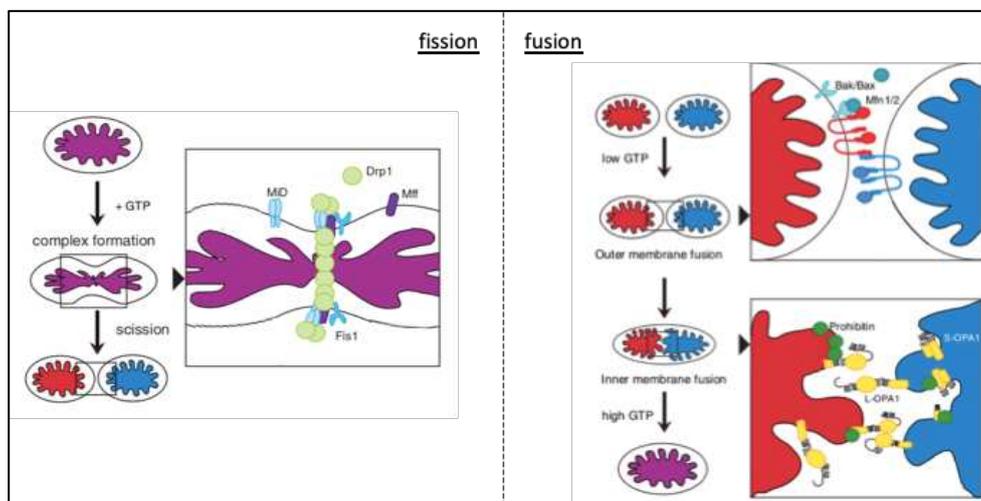


Figure 4: Les mécanismes de fission et de fusion chez les mammifères. *A gauche*, la fission, qui consiste en la constriction et la scission des membranes mitochondriales, implique le recrutement de Drp1 à la MME sur des récepteurs tels que Mff (Mitochondrial Fission Factor), MiDs et Fis1. *A droite*, la fusion des membranes externes est dépendante des mitofusines MFN1/2. En cas d'apoptose, Bax/Bak peuvent inhiber la fusion par interaction avec MFN1/2. La fusion des MMI est principalement dirigée par OPA1 qui, s'oligomérisse grâce au GTP. Modifié à partir de (Palmer et al., 2011).

1.2.2. Dysfonctions et pathologies liées à la dynamique mitochondriale

La dérégulation de la balance entre fusion et fission perturbe l'intégralité des mitochondriales et par voie de conséquence aussi les fonctions cellulaires. Par exemple, la perte d'OPA1 entraîne une déstabilisation de la MMI, la libération de cytochrome C et conduit à l'apoptose (Olichon et al., 2003). Par ailleurs, des atteintes de la dynamique mitochondriale entraînent des dysfonctions graves des tissus neuronaux et musculaires (Vidoni et al., 2013), et sont retrouvés dans de nombreuses pathologies telles que la maladie de Parkinson (Von Stockum et al., 2016), le cancer (Trotta and Chipuk, 2017) ou encore le diabète de type 2 (Rovira-Llopis et al., 2017). Des mutations du gène *OPA1* sont responsables de l'Atrophie Optique Dominante (Lenaers et al., 2012), une neuropathie optique héréditaire qui a donné son nom à la protéine (Burté et al., 2015) caractérisée par la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine dont les axones constituent les nerfs optiques.

Les souris *Opa1*^{-/-} ne sont pas viables contrairement aux souris hétérozygotes qui présentent une réduction de l'expression de la protéine de 50% dans tous les tissus. Ces souris développent des symptômes variés, dont la dégénérescence des nerfs optiques et dysfonctions cardiaques (Chen et al., 2012, Sarzi et al., 2012). De même, la délétion *in vitro* de MFN1 ou MFN2 empêche la fusion amenant à un réseau fragmenté. *In vivo*, celle-ci induit une létalité embryonnaire chez les souris (Chen et al., 2003) et des mutations pathogènes de *MFN2* sont responsables de la maladie de Charcot-Marie-Tooth type 2A (CMT2A), caractérisée par une neuropathie périphérique et une atrophie musculaire (Burté et al., 2015).

De la même façon que pour les cellules, les fibroblastes issus de patients présentant une mutation hétérozygote de *DRP1* présentent un réseau mitochondrial hyper connecté (Gerber et al., 2017). Similairement à *OPA1*, les souris *Drp1*^{-/-} sont létales à un stade embryonnaire (Ishihara et al., 2009) et des délétions tissulaires induisent respectivement dans le cerveau, une diminution de la formation de synapse; dans le cœur, une nécrose cardiaque et dans la lignée germinale femelle, une infertilité. Ces pathologies issues d'un défaut des mécanismes de fusion et de fission indiquent l'importance d'un équilibre de la dynamique mitochondriale.

1.3. Métabolisme énergétique

La mitochondrie est le site majeur d'oxydation des sucres, des lipides et des protéines, aboutissant à la production d'ATP, indispensable à la cellule pour ses besoins énergétiques. La glycolyse, la β -oxydation des acides gras et le cycle de Krebs permettent de fournir les intermédiaires NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) et FADH₂ (Flavin Adenine Dinucleotide) réduits, nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

1.3.1. La glycolyse

La glycolyse a lieu dans le cytoplasme et permet de convertir le glucose en pyruvate. Celui-ci est ensuite transporté dans la matrice mitochondriale et converti en acetyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase. La glycolyse est composée de 10 réactions enzymatiques qui peuvent se résumer en trois étapes principales. Une première phase d'activation des hexoses par phosphorylations successives implique l'hexokinase, la phosphoglucose isomérase et la phosphofructose kinase, et la consommation de 2 molécules d'ATP. Une deuxième phase permet la formation du glycéraldéhyde 3-phosphate grâce à l'aldolase et la phosphotriose isomérase. La troisième phase est une phase de libération d'ATP. Le glycéraldéhyde 3-phosphate est phosphorylé en 1,3-biphosphoglycérate par la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, permettant la formation de NADH. Le 1,3-biphosphoglycérate est converti en 3-phosphoglycérate en libérant une molécule d'ATP, puis isomérisé et déshydraté pour former le phosphoénolpyruvate. Enfin, ce dernier est converti en pyruvate par la pyruvate kinase, libérant encore un ATP. En résumé, lors de la glycolyse, le glucose est phosphorylé et clivé pour produire deux molécules de glycéraldéhyde 3-phosphate induisant la consommation de 2 ATP. Ces molécules sont ensuite converties en pyruvate permettant la libération de 4 ATP et 2 NADH. Le bilan de la glycolyse est donc la production de 2 ATP et 2 NADH.

1.3.2. La β -oxydation des acides gras

La β -oxydation permet de convertir les acides gras en acetyl-CoA dans la mitochondrie (Bartlett and Eaton, 2004). Elle débute dans le cytosol avec la liaison d'un acide gras au coenzyme A menant à la formation d'acyl-CoA qui est transféré dans la matrice mitochondriale à l'aide d'un système de translocase. Une fois dans la matrice, l'acyl-CoA permet la formation d'acetyl-CoA grâce à quatre étapes libérant un NADH et un FADH₂.

1.3.3. Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, localisé dans la matrice mitochondriale utilise le pyruvate comme substrat et permet la réduction des NAD et FAD en NADH et FADH₂, cofacteurs essentiels à la chaîne respiratoire. Produit de la glycolyse, le pyruvate est d'abord transporté dans la matrice mitochondriale puis converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase. A l'entrée du cycle de Krebs, les deux carbones de l'acétyl-CoA s'associent avec l'oxaloacétate (C4) pour former le citrate. Par la suite, sept étapes enzymatiques s'enchainent pour oxyder le citrate en oxaloacétate permettant la libération d'électrons captés par les cofacteurs NADH et FADH₂. L'oxaloacétate initie alors un nouveau cycle, tandis que les cofacteurs réduits peuvent alimenter la chaîne respiratoire. En résumé, une molécule à deux carbones permet la production de 3 molécules de NADH et une molécule de FADH₂ qui seront oxydés par la chaîne respiratoire permettant de fournir respectivement 3 et 2 ATP.

1.3.4. La phosphorylation oxydative

Le système de phosphorylation oxydative (OXPHOS) est composé des quatre complexes de la chaîne respiratoire le complexe I ou NADH déshydrogenase, le complexe II ou succinate déshydrogenase, le complexe III ou cytochrome c réductase et le complexe IV ou cytochrome c oxidase, et de l'ATP synthase (Fig.5) enchassés dans la MMI. Chacun de ces complexes est composé de multiples sous-unités, codées soit par le génome nucléaire soit par le génome mitochondrial à l'exception du complexe II, entièrement codé par le génome nucléaire. Les cofacteurs réduits NADH et FADH₂ générés par le cycle de Krebs sont des donneurs d'électrons pour les réactions d'oxydo-réductions, qui conduisent à la réduction de l'oxygène et la génération d'un gradient de protons (ΔpH) et d'un potentiel de membrane ($\Delta\psi\text{m}$), de la matrice vers l'espace intermembranaire. Des transporteurs d'électrons permettent également le fonctionnement de la chaîne respiratoire : le coenzyme Q entre les CI, CII et CIII et le cytochrome c entre le CIII et le CIV. La différence de potentiel est utilisée pour alimenter la synthèse d'ATP lors de la dernière étape de la phosphorylation oxydative grâce, au complexe V ou ATP synthase.

Le complexe I, avec ses 45 sous-unités, est le plus gros complexe de la chaîne respiratoire. Il permet la fixation du NADH grâce à un site de liaison localisé sur le bras matriciel hydrophile du complexe et permet la libération de 2 électrons. Ceux-ci passent à travers le complexe, entraînant la translocation de quatre protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le complexe II est un complexe de 123kDa, qui se distingue des autres complexes parce qu'il est d'une part, entièrement codé par le génome nucléaire et d'autre part il ne permet pas le passage de protons. Il oxyde le FADH₂, en transférant des électrons au coenzyme Q. Celui-ci, une fois réduit donne ses électrons au troisième complexe de la ETC : le cytochrome c reductase. Le complexe III permet le transfert des électrons, couplé à la translocation de quatre protons, à deux molécules de cytochrome c, une protéine soluble qui joue également un rôle dans l'apoptose. Enfin, le complexe IV ou cytochrome c oxidase induit la réduction d'une molécule de dioxygène en deux molécules d'eau avec un passage de quatre protons à travers la MMI. L'énergie libérée par le passage des électrons dans les complexes I, III et IV au cours des différentes réactions permet de pomper les protons de la matrice vers l'espace inter membranaire, même contre un gradient de concentration. L'ATP synthase agit comme un moteur moléculaire qui, grâce au gradient électrochimique, permet le retour des protons dans la matrice et la phosphorylation réversible de l'ADP en ATP.

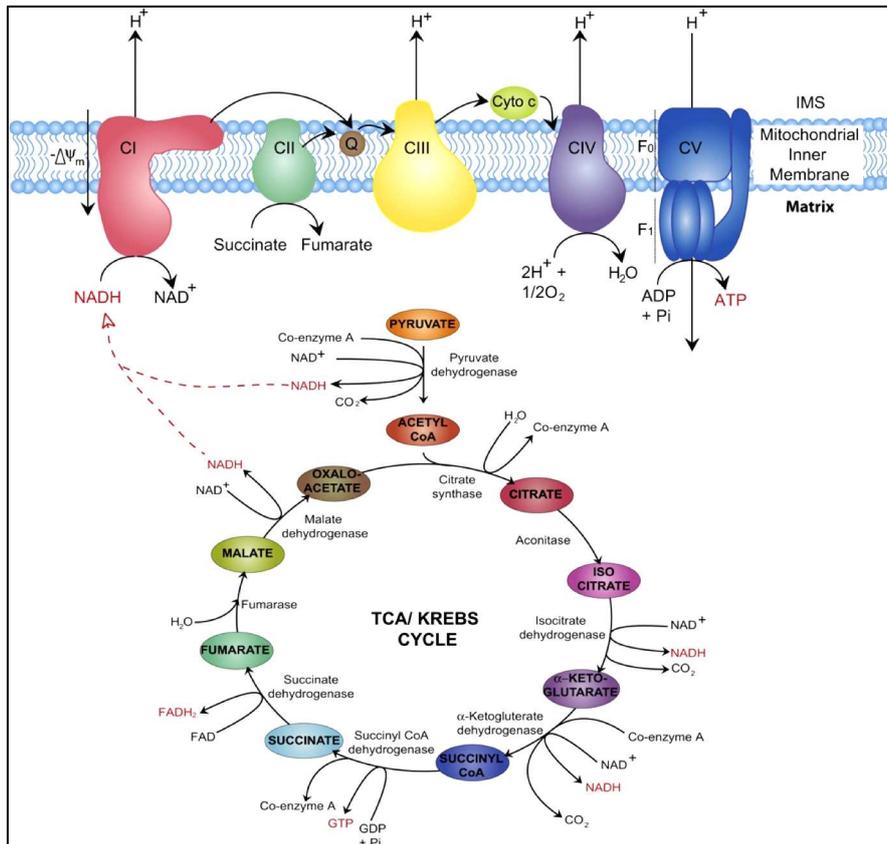


Figure 5: Schéma représentant le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons. Le pyruvate est converti en NADH, FADH₂ et GTP grâce aux différentes enzymes du cycle de Krebs. Le transfert des électrons au travers des complexes de la chaîne respiratoire induit un potentiel de membrane. Lors de la dernière étape, l'ADP est phosphorylé pour former l'ATP grâce au complexe V (ATP synthase) (Osellame et al., 2012).

2. ADN mitochondrial

La mitochondrie se distingue des autres organites des cellules eucaryotes, puisqu'elle possède son propre génome ainsi que son propre cycle de réplication. Les mitochondries sont ainsi sous le contrôle de deux génomes. La découverte de l'ADN mitochondrial (ADNmt) date du début des années 1960, lorsque Nass a publié des images de microscopie électronique avec un marquage d'ADN dans des mitochondries de foie de poulet (Nass, 1966). Extrêmement polymorphe, l'ADNmt forme un double brin circulaire de plus de 16.000 pb, et constitue à lui seul quelques 2% de l'ADN total de cellules somatiques, et jusqu'à 50% de l'ADN total de l'ovocyte. Parmi les 1500 à 2000 protéines mitochondriales, la quasi-totalité est d'origine nucléaire, à l'exception des 13 protéines impliquées dans la chaîne respiratoire, codées par le génome mitochondrial (Calvo and Mootha, 2010).

2.1. Structure

2.1.1. Les spécificités de l'ADNmt par rapport à l'ADN nucléaire

L'ADNmt se différencie de l'ADN nucléaire (ADNn) en de multiples points. Tout d'abord, à l'instar de l'ADN bactérien, l'ADNmt forme un double brin circulaire composé d'un brin sens nommé brin lourd (*Heavy strand* = H) et d'un brin antisens nommé brin léger (*Light* = L). Chez l'Homme, il est composé de 16569 pb, contre plus de 3 milliards de pb pour l'ADNn (Anderson et al., 1981). Sa transmission uniquement maternelle distingue aussi le génome mitochondrial du génome nucléaire (Giles et al., 1980). Au cours de la spermatogenèse, la quantité d'ADNmt décroît d'une centaine de copies à 1,4 copie en moyenne par spermatozoïde, suggérant que la majorité des mitochondries du spermatozoïde sont dépourvues d'ADNmt, afin de limiter sa transmission (May-Panloup, 2003). Cette réduction est associée à une ubiquitination d'une protéine membranaire mitochondriale, la prohibitine, durant la spermatogenèse, entraînant la destruction progressive des mitochondries paternelles juste après la fécondation (Sutovsky et al., 2000). L'ADNmt contient très peu de séquences non codantes (~3%) et aucune séquence intronique. Contrairement au génome nucléaire, il n'est pas organisé sous la forme de chromatine. De ce fait et parce qu'il est localisé proche de la chaîne respiratoire et donc des espèces réactives de l'oxygène (ERO), l'ADNmt a un taux de mutagenèse élevé. Enfin, les cellules humaines peuvent contenir de quelques dizaines à quelques milliers de copies d'ADNmt réparties dans plusieurs centaines de mitochondries (Miller et al., 2003). On appelle hétéroplasmie la co-existence de copies mutées et saines d'ADNmt au sein d'une même cellule. Il est important de noter que la proportion de ces copies mutées peut être variable entre types cellulaires et entre organes, et qu'elle est corrélée avec la sévérité des signes cliniques.

2.1.2. Organisation de l'ADNmt

Dans les cellules humaines, l'ADNmt comporte 37 gènes, 13 codent pour des protéines des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire, deux pour les ARN ribosomiaux (ARNr) et 22 pour les ARN de transfert (ARNt) nécessaires à la traduction (Fig.6). Tandis que le gène ND6 et 8 ARNt sont codés par le brin L, les 12 autres gènes codant les protéines de la chaîne respiratoire, les deux ARNr et 14 ARNt sont portés par le brin H. L'ADNmt contient également deux régions non codantes : une première de 1200pb nommée D-loop pour « déplacement

côté matriciel, et leur nombre est variable selon les tissus. Ils forment des unités autonomes de réplication et sont distribués uniformément dans le réseau mitochondrial. Les défauts de cette distribution sont associés à de nombreuses pathologies humaines (Yan et al., 2019).

2.2. Réplication et transcription

2.2.1. Mécanisme de réplication du génome mitochondrial

Contrairement à l'ADN nucléaire qui se réplique uniquement pendant la division cellulaire, la synthèse de l'ADNmt est indépendante, et se poursuit en absence de toute division cellulaire. Un grand nombre de protéines intervient dans la réplication de l'ADNmt pour former le complexe enzymatique de réplication ou réplisome. Les différents acteurs de la réplication et de la synthèse de l'ADNmt sont POLG, TFAM, mtSSB, POLRMT et Twinkle (Fig.7) :

- POLG est la seule polymérase trouvée dans les mitochondries de mammifère. C'est un hétérotrimère composé d'une sous-unité catalytique p140 (codée par POLG1) de 140 kDa, et de deux sous-unités accessoires p55 (codées par POLG2). POLG1 possède 3 domaines permettant la synthèse d'ADN et un domaine exonucléase 3' → 5' responsable de la correction des bases mesappariées, pendant la réplication. POLG2 maintient la liaison à l'ADN et augmente la « processivité » de la synthèse de l'ADNmt.
- Les mtSSB forment des tétramères très fortement liés à l'ADNmt. L'analyse de leur structure montre qu'ils sont enveloppés par l'ADNmt simple brin et joueraient un rôle dans la stabilisation de la structure du D-loop et des intermédiaires de la réplication de l'ADNmt.
- TFAM a d'abord été caractérisé comme un facteur de transcription mitochondrial, puis comme un membre de la famille des protéines HMG (High-Mobility Group), contenant deux motifs HMG et une extrémité C-terminale nécessaire à l'activation de la transcription. TFAM participe à l'initiation de la réplication. Elle se lie à l'ADNmt en induisant une flexibilité structurelle et enveloppe l'ADNmt double brin de façon séquence non spécifique en permettant sa compaction.
- Les hélicases sont des enzymes très conservées qui catalysent le déroulement des deux brins d'ADN. La principale est Twinkle mais il en existe d'autres au sein de la mitochondrie moins bien caractérisées : DNA2, PIF1 et RECQL4. L'hélicase Twinkle appartient à la superfamille 4 (SF4) et forme une structure d'hexamères en forme d'anneau pour ouvrir le double brin d'ADN. En N-terminal, Twinkle possède un domaine de liaison à l'ADN double brin et une activité hélicase; en C-terminal, elle contient cinq motifs hélicase hautement conservés (Akhmedov and Marín-García, 2015).

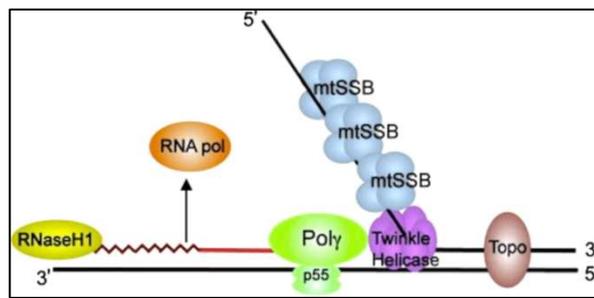


Figure 7: Schéma représentant les protéines nécessaires à la réplication de l'ADNmt. L'ADN naissant (ligne droite rouge) est synthétisé par POLG (vert), alors que le primer d'ARN (ondulé, rouge) est généré par la polymérase ARN (orange) et dégradé par la RNase H1 (jaune). L'hélicase Twinkle (violet) permet d'ouvrir les brins d'ADN en amont, formant ainsi un ADN simple brin stabilisé par les mtSSB (bleu). Enfin, les topoisomérases (marron) résorbent la tension de torsion de l'ADN créée par l'ouverture des brins (Kasiviswanathan et al., 2012).

La réplication de l'ADNmt est fortement liée à sa transcription. En effet, la réplication est initiée par la synthèse d'un transcrite précurseur par l'ARN polymérase (POLRMT) à partir d'un promoteur du brin léger (LSP = Light strand promoter) jusqu'à O_H . Une ribonucléoprotéine : RNase MRT clive ensuite le précurseur au niveau de la séquence CSB (Conserved Sequence Blocks) créant une amorce ARN mature. POLG peut alors répliquer le brin lourd de l'ADNmt à partir de cette amorce et la synthèse s'achève au niveau des séquences TAS (Termination Associated Sequences). La transcription est initiée par trois sites localisés au niveau de la région contrôle. Elle est bidirectionnelle et permet la genèse de transcrits polycistroniques qui devront ensuite être clivés pour libérer les transcrits d'ARNm, ARNt et ARNr. La POLRMT interagit avec TFAM, sous la régulation de NRF1 et 2, pour lui permettre de se fixer aux séquences promotrices du brin léger et du brin lourd. NRF1 est un acteur de la coordination d'expression des gènes mitochondriaux et nucléaires en activant leur transcription dont ceux des quatre complexes de la chaîne respiratoire de l'ATPase et de TFAM. NRF2 est un second facteur de transcription des gènes de la chaîne respiratoire et d'autres impliqués dans de multiples fonctions mitochondriales. Ces deux activateurs de la transcription sont eux-mêmes sous le contrôle de PGC1 α (PPAR gamma co-activator 1), PGC1 β et PRC (Pgc1 related co-activator).

2.2.2. Les modèles de réplication et de compaction de l'ADNmt

L'ADNmt humain peut exister en un cercle relâché ou super-enroulé, comme une molécule linéaire ou un dimère circulaire. De plus, au moins deux molécules circulaires peuvent être liées. On retrouve ces formes typologiques également dans les tissus de souris (Kolesar et al., 2013; Pohjoismäki and Goffart, 2011). Il existe plusieurs modèles de la réplication mitochondriale : déplacement de brin, RITOLS, réplication couplée (McKinney and Oliveira, 2013). Le modèle de déplacement de brin est asynchrone. Il implique deux origines indépendantes, unidirectionnelles. Selon ce modèle, le brin lourd est d'abord synthétisé jusqu'à ce que l'origine de réplication du brin léger soit atteinte. Le brin léger commence alors sa synthèse dans le sens opposé (Clayton, 2003). A l'inverse, le modèle de réplication couplée consiste en une synthèse d'ADNmt simultanée et unidirectionnelle des deux brins (Holt, 2000). Il est possible que les deux modèles de réplication co-existent au sein d'une même cellule, et que l'altération de l'un ou l'autre de ces mécanismes induise une variation du nombre de copies d'ADNmt.

2.3. Importance de la quantité d'ADNmt

Des défauts dans les composants de la machinerie assurant la maintenance de l'ADNmt et notamment la réplication peut résulter en deux types d'altérations : une dégradation qualitative de l'ADNmt avec une accumulation de mutations et de délétions, ou une modification quantitative du nombre de copies de l'ADNmt, les deux entraînant des perturbations sévères de la fonction mitochondriale, responsables de pathologies sévères. (Copeland and Longley, 2014).

Dès les années 1970, l'existence d'un turnover, impliquant une néo-synthèse et une dégradation de l'ADNmt a été corrélée avec le processus de maintenance de l'ADNmt (Berk and Clayton, 1974). Le taux de turnover est variable suivant les tissus. Chez un modèle de rat, il est très élevé pour le cœur, le foie et le rein et faible pour le cerveau (Gross et al., 1969), contrastant avec le fait que les tissus les plus demandeurs en énergie sont le cerveau, le cœur, le foie et les muscles (Kelly et al., 2012). De plus, le nombre de copies d'ADNmt par cellule présente lui-même des variations selon les tissus en fonction de leurs besoins énergétiques. Ainsi, lors de l'ovogenèse, les cellules germinales primordiales observent une réduction progressive du nombre de copies d'ADNmt, avec une ségrégation des mutations de l'ADNmt dans le but d'obtenir une population homoplasmique. Ensuite, une expansion massive de la quantité d'ADNmt jusqu'à plusieurs centaines de milliers de copies dans l'ovocyte mature a lieu : c'est ce qu'on appelle le « goulot d'étranglement » mitochondrial (*bottleneck*) (Wai et al., 2008). En corollaire au taux de réplication, se pose la question du choix des molécules d'ADNmt devant être répliquées ou dégradées. Compte tenu de la vulnérabilité de l'ADNmt aux dommages, la cellule pourrait éliminer les copies endommagées de façon préférentielle, afin de maintenir un pool de copies intacts d'ADNmt (Kai et al., 2006). Ainsi, la régulation de la quantité d'ADNmt selon les tissus, le type cellulaire et le stade de développement implique différents mécanismes.

2.3.1. Corrélation avec l'expression des protéines de réplication (Modèles murins de défaut de réplication du génome mitochondrial)

Des défauts de la maintenance de l'ADNmt sont associés à des pathologies humaines. Etant donné que POLG est l'unique polymérase mitochondriale et agit à la fois sur la réplication et la réparation de l'ADNmt, il n'est pas surprenant que plus de 200 mutations de *POLG1* et *POLG2* aient été identifiées associées à des pathologies mitochondriales. Dans ce sens, les souris *PolgA* *-/-* présentent une diminution drastique de l'ADNmt aux stades embryonnaires, et une déficience sévère de la chaîne respiratoire conduisant à une létalité (Hance et al., 2005).

Des modèles transgéniques de souris ont également confirmé le rôle essentiel de TFAM dans la compaction et la maintenance de l'ADNmt. Les souris *Tfam* *-/-* présentent une létalité embryonnaire précoce avec une perte de l'ADNmt alors que les souris *Tfam* *+/-* ont environ deux fois moins d'ADNmt (Larsson et al., 1998). Inversement, une surexpression de TFAM humain chez la souris induit une augmentation du nombre de copies d'ADNmt (Ekstrand, 2004). A l'inverse, une perte de TFAM induit une déplétion de l'ADNmt, notamment par un turnover augmenté et une inhibition de l'initiation de la transcription dans un modèle de cellules de drosophile. Ainsi, TFAM représente un élément clé de la régulation du nombre de copies de l'ADNmt (Matsushima et al., 2010).

De même, les souris *Polrmt* *-/-* (Kühl et al., 2016) et *Twinkle* *-/-* (Milenkovic et al., 2013) sont létales à un stade embryonnaire (E8.5), associées avec une altération de la chaîne respiratoire, une dysfonction mitochondriale et une diminution drastique de la quantité d'ADNmt.

2.3.2. Le pool de dNTP mitochondriaux

En plus des protéines du réplisome de l'ADNmt, la synthèse d'ADNmt nécessite un apport équilibré en déoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs) (Fig.8). Les dNTP mitochondriaux proviennent de deux voies distinctes localisées dans le cytoplasme et la mitochondrie. Les nucléosides et nucléotides nécessaires à la synthèse du pool de dNTP sont échangés grâce à des transporteurs dédiés. D'une part, les dNTP peuvent provenir d'un transport actif des dNTP cytosoliques synthétisés *de novo* et régulés par le cycle cellulaire, avec une conversion des ribonucléotides en dNTP, durant la phase S. L'autre voie est qualifiée de voie de récupération ou de sauvetage, est nécessaire pour fournir des dNTP à la mitochondrie indépendamment de l'étape du cycle. Dans ce cas, les dNTP sont produits à partir de deoxynucleosides par phosphorylation pour synthétiser des précurseurs d'ADN (El-Hattab and Scaglia, 2013).

Comme la synthèse d'ADNmt est indépendante du cycle cellulaire, la seconde voie est essentielle à la maintenance de l'ADNmt. Cette voie implique trois étapes de phosphorylation consécutives. La première consiste en la récupération des purines et pyrimidines via l'intermédiaire de deux kinases déoxyribonucléosides : thymidine kinase 2 (TK2) et déoxyguanosine kinase (dGK). TK2 est spécifique des déoxypyrimidine et dGK des déoxypurines. Les deux étapes de phosphorylation suivantes sont prises en charge par les kinases NMPK (deoxyribonucleoside monophosphate kinase) et NDPK (deoxyribonucleoside diphosphate kinase). Dans des cellules en division, la voie de synthèse *de novo* prime (Fig.8 - gauche). Inversement, pour les cellules en phase stationnaire, la synthèse d'ADN nucléaire est quasi nulle, réduisant les précurseurs cytoplasmiques d'ADN. La synthèse de dNTP cytosoliques et de TK1 est donc sous-réglée, forçant la synthèse du pool de dNTP mitochondriaux par les deux kinases TK2 et dGK (Fig.8 - droite). Enfin, la synthèse de dNTP est régulée par des enzymes cataboliques dans le cytoplasme (dNT-1) et au sein de la mitochondrie (dNT-2), et par une enzyme de dégradation de des nucléosides (PNP) (Saada, 2009).

Des mutations des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la voie de récupération induisent un déséquilibre de composition du pool de dNTP et des formes sévères de syndrome de déplétion de l'ADNmt (mtDNA depletion syndrome - MDS) (Copeland, 2012) avec de fortes spécificités tissulaires. Ainsi, les mutations de dGK sont associées avec une déplétion de l'ADNmt au niveau hépato-cérébral (Brahimi et al., 2009), alors que les mutations de TK2 induisent essentiellement des symptômes musculaires (Mancuso et al., 2003). Dans ce sens, une analyse *in silico* a montré que la voie de récupération serait insuffisante pour prendre en charge une réplification rapide de l'ADNmt, et aurait plus un rôle de soutien à la première voie, expliquant une différence d'impacts des mutations selon les tissus (Gandhi and Samuels, 2011).

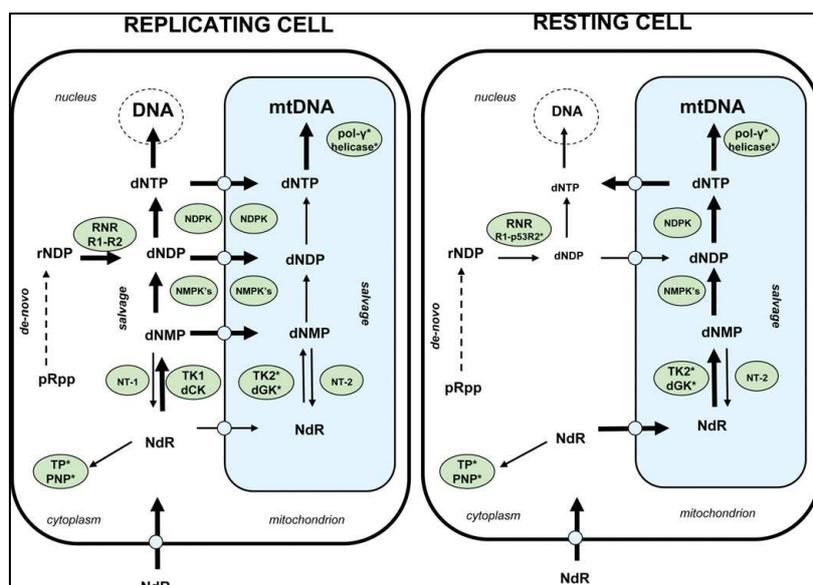


Figure 8: Schéma représentant les protéines impliquées dans les voies principales de régulation du pool de dNTP régulant la réplication de l'ADNmt : la voie de synthèse *de novo* et la voie de récupération des dNTP. A gauche, dans les cellules qui se répliquent, les dNTP cytosoliques proviennent surtout de la synthèse de novo à partir de pRpp et de la voie de sauvetage cytosolique. A droite, dans les cellules au repos, la synthèse de l'ADN nucléaire est peu importante, contrairement à l'ADNmt ; dans ce cas, la voie la plus utilisée est la voie de récupération mitochondriale. pRpp (phosphoribosyl pyrophosphate) ; rNDP (ribonucleotide diphosphate) ; TK2 = mitochondrial thymidine kinase 2 ; dGK = mitochondrial deoxyguanosine kinase ; NDPK = nucleoside diphosphate kinase ; pol-γ = POLG = DNA polymerase gamma ; TP = thymidine phosphorylase ; PNP = purine nucleoside phosphorylase ; RNR = ribonucleotide reductase ; NdR = deoxyribonucleosides ; dNMP = deoxynucleoside monophosphate ; dNDP = deoxynucleoside diphosphate ; dNTP = deoxynucleoside triphosphate ; NT-1 = deoxyribonucleotidase (cytoplasmic) ; NT-2 = deoxyribonucleotidase (mitochondrial) = NDP = nucleoside diphosphate ; dTMP = deoxythymidine monophosphate ; TK1 = cytosolic thymidine kinase 1 ; (Saada, 2009).

2.3.3. Rôle des contacts entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique

Il existe un lien étroit entre les divisions mitochondriales et la maintenance de l'ADNmt, illustré par l'accumulation de délétions et/ou une déplétion de l'ADNmt dans des situations où la dynamique mitochondriale est affectée (Ishihara et al., 2015). Chez la levure, les sites de division du réseau mitochondrial se localisent au niveau des structures ERMES (ER-Mitochondria Encounter Structure), et sont associés spatialement aux nucléoïdes, suggérant un rôle des contacts RE-mitochondrie dans la maintenance de l'ADNmt (Murley et al., 2013). De même, dans les cellules humaines, la proximité du RE et des nucléoïdes serait nécessaire à la réplication et au maintien de l'ADNmt (Lewis et al., 2016). En effet, les nucléoïdes qui initient une synthèse d'ADNmt sont liés spatialement et temporellement aux contacts RE-mitochondrie, et associés aux sites de division mitochondriale. Ainsi, la réplication de l'ADNmt, au niveau des sites de division, précéderait la constriction des membranes et le recrutement et l'assemblage des protéines impliquées dans la fission (Fig.9).

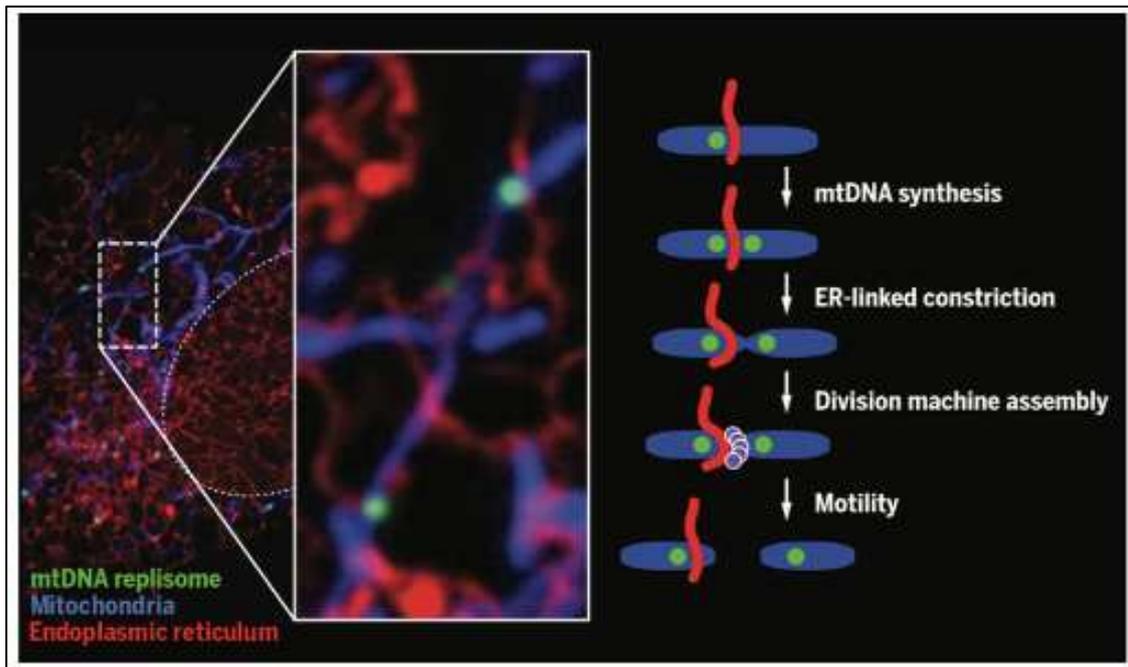


Figure 9: Les contacts entre le RE et la mitochondrie permettent la synthèse d'ADNmt au niveau des sites de division mitochondriale. A gauche, dans des cellules d'ostéosarcome U2OS, les nucléoïdes sont marqués par POLG2 en vert, les mitochondries par mito-BFP en bleu et le reticulum endoplasmique par KDEL-mRuby en rouge. A droite, une représentation schématique du mécanisme observé (Lewis et al., 2016).

Ce mécanisme aboutirait à une répartition organisée et homogène de l'ADNmt au sein du réseau mitochondrial. En condition physiologique, la fission mitochondriale, sous la dépendance du RE, est adjacente aux nucléoïdes, prévenant un regroupement des nucléoïdes. Lorsque la dynamique mitochondriale est perturbée, la maintenance de l'ADNmt par voie de conséquence est altérée. Dans les cellules *Mfn1*^{-/-}, *Mfn2*^{-/-} ou *Opa1*^{-/-}, dans lesquelles la fusion mitochondriale est inhibée, la plupart des mitochondries sont dépourvues de nucléoïde (Chen et al., 2007). A l'inverse, si la fission mitochondriale est inhibée, les nucléoïdes se regroupent, provoquant une distribution anormale de l'ADNmt et une modification de la morphologie des mitochondries présentant un aspect gonflé (Ban-Ishihara et al., 2013).

Récemment, les microtubules ont été associés dans le mécanisme permettant le transport et la distribution des nucléoïdes. En effet, au niveau des zones de contacts entre le RE et la mitochondrie, les nucléoïdes interagissent avec le complexe MICOS (Mitochondrial Contact Site and cristae Organizing system), essentiel au maintien de la structure des crêtes présent sur la membrane interne mitochondriale. Le complexe MICOS se lie à Miro1, présent dans les zones de contacts RE-mitochondrie. Miro1 recrute le moteur des microtubules KIF5B à la mitochondrie pour leur transport le long du cytosquelette. De fait, les mitochondries sont transportées le long des microtubules, guidés par KIF5B, par un complexe incluant les nucléoïdes (Qin et al., 2020).

2.3.4. Défauts de l'ADNmt

La proximité de l'ADNmt avec les sites de production de ROS le rend vulnérable aux lésions oxydatives. De plus, en absence de protection par une structure de type chromatine, l'ADNmt est plus fréquemment soumis à des

mutations qui potentiellement peuvent induire des dysfonctions de la chaîne respiratoire. Ainsi, l'ADNmt présente un taux de mutagenèse 10 à 20 fois plus important que le génome nucléaire (Brown et al., 1979; Richter et al., 1988).

Au sein des pathologies mitochondriales, on distingue les MDS (mtDNA-depletion syndromes) qui sont caractérisés par une diminution sévère du nombre de copies d'ADNmt. Ces déplétions conduisent à des défauts de synthèse des complexes I, II, IV et V de la chaîne respiratoire, dont certaines sous-unités sont codées par le génome mitochondrial. L'hypothèse d'un seuil maximal et minimal de contrôle du nombre de copies d'ADNmt a été proposée, impliquant des acteurs encore inconnus, favorisant soit une réplication de l'ADNmt en cas de nombre de copies trop faible, soit la dégradation de ADNmt en cas de nombre excessif de copies (Clay Montier et al., 2009). L'altération de ces mécanismes entraîne des situations pathologiques, dont une diminution d'ADNmt observées chez les patients atteints maladie de Parkinson (Bender et al., 2006), d'hépatopathie (Morten et al., 2007), de cardiomyopathie (Bai and Wong, 2005), du cancer du sein (Yu et al., 2007) ou de carcinomes rénaux (Xing et al., 2008).

3. Le réticulum endoplasmique

Comme déjà évoqué, le réticulum endoplasmique (RE), organite « voisin » de la mitochondrie, joue un rôle primordial dans la régulation mitochondriale. Le RE est l'un des organites les plus volumineux de la cellule et pourtant, il fait partie des derniers organites à avoir été caractérisé. D'abord décrit comme un « reticular apparatus » (Veratti, 1961), la microscopie électronique a mis en évidence sa structuration en réseau tubulaire (Palade, 1955). Ses rôles primordiaux sont impliqués dans la synthèse des protéines et des lipides, et la régulation calcique en lien avec les organites adjacents. La complexité de son architecture reflète la diversité de ses fonctions.

3.1. Structure

Le RE se distingue en deux parties : une structure associée à l'enveloppe nucléaire et une structure périphérique qui inclut des tubules lisses et des feuilletts rugueux. Alors que l'organite se définit comme un long réseau interconnecté avec une membrane continue, les différentes structures du RE déterminent leur fonction. L'enveloppe nucléaire est composée de deux couches lipidiques : la membrane nucléaire externe (MNE) et la membrane nucléaire interne (MNI) qui délimite un compartiment interne nommé lumen ou lumière. La forme de l'enveloppe nucléaire est maintenue par des protéines de la MNI qui permettent la liaison de la chromatine, l'association au cytosquelette ou la présence de multiples pores nucléaires. Ces derniers traversent les MNI et MNE pour permettre le transport de molécules vers le cytoplasme (Westrate et al., 2015).

L'enveloppe nucléaire est connectée au RE périphérique. Celui-ci se compose d'une double couche lipidique avec une lumière dont la taille peut varier, allant jusqu'à 50nm chez les mammifères (Shibata et al., 2010). Les études de microscopie électronique ont pu démontrer que les feuilletts étaient d'aspect rugueux, définis par la haute densité de ribosomes présents sur leur surface cytosolique. Le qualificatif de RE Rugueux (RER) leur est ainsi attribué en comparaison au RE Lisse (REL), composé par des tubules dépourvus de ribosomes à leur surface. Le RER est, grâce à ces ribosomes, le principal site de synthèse, de repliement et de modifications post-traductionnelles des protéines. Cependant, aujourd'hui, l'organisation de ces sous-domaines reste encore à préciser (Schwarz and Blower, 2016).

Tout comme la mitochondrie, le RE est un organite dynamique dont la structure peut varier en fonction des types cellulaires. Au sein de la cellule, il se déplace pour maintenir son réseau grâce à des protéines moteur en lien avec les microtubules. Les mouvements des tubules du RE sont guidés par coulissement le long des microtubules en allant du centre de la cellule vers la périphérie grâce notamment à la protéin moteur des microtubules : la kinesin-1. Mais les tubules du RE peuvent également se déplacer grâce à la fixation de complexes TACs (Tip Attachment Complex), composés entre autres de STIM1 (Stromal Interacting Molecule 1) et de EB1 (End-Binding protein) au niveau de l'extrémité des microtubules (Bola and Allan, 2009). Les ratios des différentes structures du RE varient et son architecture est modifiée pour correspondre aux besoins cellulaires. En effet, les tubules ont un ratio surface/volume plus élevé que celui des feuilletts, ce qui les rend plus adaptés pour des fonctions dépendantes de leur surface. A l'inverse, le volume occupé par la lumière au niveau des feuilletts est plus

important. La lumière du RE étant plus oxydante que le cytoplasme, cela permet la formation de ponts bisulfites nécessaires au repliement des protéines. Ainsi, les types cellulaires qui sécrètent peu de protéines comme les neurones ou les cellules musculaires ont un réseau tubulaire important (Terasaki et al., 2013).

3.2. Fonctions

Les études de microscopie électronique avaient, très tôt, montré une différence de fonction entre les feuillettes d'aspect rugueux et les tubules lisses du RE. Il est aujourd'hui admis que les feuillettes, organisés en couches successives, sont le site privilégié de la synthèse des protéines membranaires et sécrétées. Les tubules, quant à eux, seraient plutôt consacrés à la biogenèse lipidique et la signalisation entre le RE et les organites adjacents (Westrate et al., 2015). La fonction principale du RE est le repliement des protéines et leur orientation vers l'appareil de Golgi. Il assure ainsi la synthèse de protéines membranaires, luminales et sécrétées qui seront ensuite transloquées vers d'autres compartiments. C'est également un site de stockage de calcium intracellulaire et d'enzymes qui sont impliquées dans la synthèse des lipides cellulaires.

3.2.1. La synthèse et le repliement des protéines

Le principal rôle du RE est la synthèse des protéines membranaires et sécrétées, d'où la présence des ribosomes sur sa surface. Ce mécanisme implique un mécanisme d'ancrage co-translationnel d'un complexe ribosome/ARNm sur la membrane du RE (*expliqué dans la partie 4.2 Import vers le réticulum endoplasmique*). Dans le cas d'une protéine membranaire, sa synthèse se met en pause lors de la synthèse d'un domaine hydrophobe pour être intégrée dans la membrane du RE, puis la protéine se déplace latéralement pour s'ancrer dans la bicouche lipidique. (Schwarz and Blower, 2016). Dans le cas d'une protéine sécrétée ou destinée à d'autres organites, la protéine est synthétisée dans la lumière du RE, où elle adopte une première conformation ainsi que des modifications post-translationnelles, comme des N-glycosylations ou des oligomérisations. Enfin, soit la protéine joue un rôle dans le RE où elle achève son repliement, soit elle est redirigée vers le Golgi pour finir sa maturation et ensuite atteindre sa destination finale (Mollenhauer and Morré, 1994). Les protéines dont la localisation finale est le RE possèdent une séquence d'acides aminés KDEL (lysine, acide aspartique, acide glutamique, leucine), reconnue par un récepteur dans le cis Golgi, qui entraîne la formation d'une vésicule redirigée vers le RE (Bard et al., 2003).

3.2.2. La biogenèse lipidique

Le RE est aussi un site majeur de la biogenèse des lipides. Les voies de maturation et de transport des phospholipides sont spécifiquement localisés au niveau des contacts membranaires entre le RE et ses organites adjacents : la mitochondrie, les peroxisomes, la membrane plasmique mais aussi principalement avec l'appareil de Golgi (Appenzeller-Herzog, 2006). En effet, les contacts du RE avec la mitochondrie ou les gouttelettes lipidiques d'une part permettent l'établissement des voies de biosynthèse par fusion des membranes ou transport des lipides. D'autre part, les contacts avec la membrane plasmique, l'appareil de Golgi et les peroxisomes permettent la distribution des lipides entre les organites grâce à un mécanisme de transport vésiculaire. Ainsi, les protéines et phospholipides qui composent les membranes cellulaires sont transférés et modifiés dans une

région riche en tubules et vésicules, juxtaposée à l'appareil de Golgi, appelée ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment) (Schwarz and Blower, 2016).

3.2.3. Le métabolisme du calcium (Ca^{2+})

Outre sa contribution à la synthèse des protéines et lipides, le RE est également le principal lieu de stockage du calcium intracellulaire. Il contient beaucoup de canaux calciques, dont les récepteurs à la ryanodine (RyRs) et à l' IP_3 (inositol 1,4,5-triphosphate) (IP_3R), responsables de la libération de calcium dans le cytosol. Lorsque la phospholipase C (PLC) est stimulée par l'activation d'un récepteur couplé à une protéine G (RCPG) de la membrane plasmique, elle clive le phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP_2) en diacyl-glycerol (DAG) et IP_3 . Ce dernier peut ensuite se lier à son récepteur localisé sur la membrane du RE induisant la libération de Ca^{2+} dans le cytosol (Clapham, 2007). A l'inverse, si les stocks de Ca^{2+} s'épuisent, un mécanisme d'entrée de calcium dans le RE se met en place, appelé SOCE pour « Store-Operated Ca^{2+} Entry » (Putney, 2005). D'autres mécanismes permettant l'entrée ou la sortie de calcium du RE existent et permettent une régulation du Ca^{2+} cytoplasmique, molécule indispensable à la signalisation cellulaire. Ainsi, une libération de calcium importante peut être observée dans plusieurs mécanismes physiologiques comme la fécondation (Busa and Nuccitelli, 1985), la contraction musculaire, ainsi que dans des processus neurologiques lors de la libération de neurotransmetteurs (Mulkey and Zucker, 1991).

Par-delà ses échanges avec l'appareil de Golgi, le RE interagit aussi avec le peroxysoxe, les endosomes, les lysosomes les gouttelettes lipidiques ou la membrane plasmique, formant des sites de contact étroits avec eux, et notamment les mitochondries, via des structures appelées MAM (Mitochondrial Associated Membranes) (Rowland and Voeltz, 2012).

3.3. Les MAM (Mitochondrial Associated Membranes)

3.3.1. Définition et découverte

On appelle « site de contacts » (Membrane Contact Site = MCS), toutes les structures rapprochant les membranes de deux organites, sans pour autant qu'elles ne fusionnent (Phillips and Voeltz, 2016a). S'il était déjà communément admis que les mitochondries étaient très proches du RE, leur interaction physique au travers de sites de contact n'a été mis en évidence que récemment. L'amélioration des techniques de microscopie électronique a permis de mettre en évidence l'existence d'un contact entre la MME et celle du RE, grâce à des modèles d'hépatocytes de rat et de cellules de *Tetrahymena* (un protozoaire), dès 1971 (Franke and Kartenbeck, 1971). Cette découverte fut vivement critiquée à ses débuts car elle était considérée comme un artefact. Néanmoins, se posait déjà la question du rôle de ces structures et d'un transfert possible de protéines et de composants lipidiques du RE vers la mitochondrie. Grâce à la mise au point d'un protocole permettant d'isoler des fractions membranaires associées aux mitochondries de foie de rat, a été mis en évidence les premières Mitochondria-Associated Membranes (MAM) (Vance, 1990). Ces membranes semblaient jouer un rôle dans la synthèse et le transfert de lipides entre le RE et la mitochondrie. Les MAM ont depuis été identifiées chez de multiples espèces allant de la levure aux mammifères. Chez la levure, le complexe ERMES (ER-Mitochondria

Encounter Structure) est composé des protéines Mmm1, Mdm10, Mdm 12 et Mdm 34. Ce complexe, qui permet de maintenir les sites de contacts entre RE et mitochondrie serait également nécessaire à la morphologie et la distribution mitochondriale (Vance, 2014a).

3.3.2. Structure et composition

Les MAM sont des structures stables car même lorsque le RE et les mitochondries se déplacent le long du cytosquelette, ils restent attachés l'un à l'autre, sans interruption notable de leur contact, permettant un maintien de la synergie de leurs fonctions. A l'inverse, les organites peuvent être séparés au niveau de cette zone de contact, puisque le lien entre eux est réversible et n'implique pas une fusion des membranes (Rowland and Voeltz, 2012) (Phillips and Voeltz, 2016a). Par ailleurs, l'imagerie 3D haute résolution a permis de déterminer l'architecture des MAM avec plus de précision. Les liens qui maintiennent ensemble les deux organites adjacents seraient longs de 9 à 16 nm pour le REL et de 19 à 30 nm pour le RER (Csordás et al., 2006), et dépourvus de ribosomes.

La plupart des protéines présentes dans les MAM ne sont pas exclusives à cette zone (Fig.10). De récentes études de protéomique ont identifié plus de 1000 protéines au niveau des MAM (Zhang et al., 2011). Ces zones présentent une forte activité de la phosphatase glucose-6-phosphate et d'autres enzymes permettant la synthèse de lipides. Les MAM sont également enrichies en acyl-CoA (cholesterol acyl-transferase) et diacylglycerol acyltransferase (DGAT) ou la phosphatidylserine (PS) synthase, suggérant un rôle des MAM dans la formation des gouttelettes lipidiques (Vance, 2014a). *A contrario*, la NADPH cytochrome c reductase est un marqueur du RE mais elle est assez peu présente (30%) dans les MAM. Une protéine se distingue pour n'être exprimée ni dans la mitochondrie ni dans le RE et donc MAM-spécifique : la phosphatidylethanolamine-N-methyltransferase-2 (PEMT), mais uniquement dans le foie et les hépatocytes primaires (Cui et al., 1993). Pour les autres types cellulaires, d'autres protéines, bien que présentes dans divers organites sont enrichies dans les MAM à l'instar du récepteur à l'inositol *tris*-phosphate receptor (IP3R), la Mitofusin (MFN2), le canal VDAC ou encore la calnexin. MFN2 est localisé au niveau des MAM et participe à des complexes homodimérique ou hétérodimérique avec lui-même ou MFN1, les deux protéines étant ancrées au niveau à la MME (de Brito and Scorrano, 2008).

Table 1 Proteins enriched in MAM of mammalian cells. (abbreviations are defined in the text).
ABCC6
Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase
Akt protein kinase
Autophagy protein, ATG14
Calnexin
Cytomegalovirus protein
Diacylglycerol acyltransferase
Dynamin-related protein, DRP1
HIV protein R
Inositol tris-phosphate receptor, IP3R
Long-chain acyl-CoA synthetase-4
Mammalian target of rapamycin mTORC
Mitofusin MNF2
Oxidoreductase Ero1
Phosphofurin acidic cluster protein, PACS-2
Phosphatidylethanolamine-N-methyltransferase
Phosphatidylserine synthase-1 and -2
Sigma-1 receptor
Stimulator of interferon genes STING
Thioredoxin-related oxidoreductase, TMX
Voltage-dependent anion channel, VDAC1

Figure 10: Tableau présentant les principales protéines retrouvées dans les MAM de cellules de mammifères (Vance, 2014a).

3.3.3. Fonctions des MAM

Les différentes fonctions des MAM sont en miroir des fonctions propres à chaque compartiment cellulaire de la zone de contact, parmi lesquelles : l'homéostasie calcique, l'importation de phosphatidylsérine dans les mitochondries, la régulation du fonctionnement mitochondrial ou encore la régulation du métabolisme (Fig.11). Des études récentes indiquent qu'une altération du contact entre les MAM et les mitochondries pourrait être à l'origine de plusieurs maladies neurodégénératives humaines, notamment la maladie d'Alzheimer et des pathologies métaboliques (Vance, 2014b).

a) La biosynthèse lipidique

Les enzymes nécessaires à la biosynthèse lipidique sont localisées soit sur la membrane du RE soit sur la membrane mitochondriale, soit sur les deux. De même, la synthèse de différents lipides passe par un transport entre les deux organites via leurs zones de contact. A ce titre, un précurseur de la PS est synthétisé dans le RE à partir de l'acide phosphatidique (PA), puis transporté à la MME par les MAM, avant d'être importé dans la MMI pour être converti en phosphatidylethanolamine (PE). De la même façon un précurseur PE localisé dans la MME sera transloqué vers le RE via les MAM pour synthétiser la Phosphatidylcholine (PC) qui pourra être de nouveau transféré à la mitochondrie. Il s'agit d'un échange bidirectionnel non-vésiculaire indispensable à la synthèse des lipides (Phillips and Voeltz, 2016b).

b) La dynamique mitochondriale

La structure des MAM est maintenue en dépit du fait que le RE, tout comme la mitochondrie, est un organite mobile et dynamique. De façon intéressante, les tubules de RE sont toujours en contact avec la mitochondrie au niveau de sites de fission, où s'organise l'oligomérisation de DRP1 en hélices dont le diamètre est inférieur au

diamètre des mitochondries, suggérant qu'il existe un mécanisme de constriction mitochondriale indépendant de DRP1. Le RE pourrait être acteur de cette constriction de la MME avant même le recrutement de DRP1 et MFF (Friedman et al., 2011). Dans les cellules de mammifères, les complexes actine-myosine sont recrutés au niveau des sites des MAMs par une protéine du RE, INF2 (Inverted Formin-2) impliquée dans l'assemblage des complexes actine-myosine permettant la constriction de la MME (Korobova et al., 2013). De plus, outre la fission, la fusion mitochondriale tributaire des mitofusines MFN1 et MFN2 à la MME et d'OPA1 la MMI, serait également impactée par les contacts RE-mitochondrie. Si la localisation de MFN1 est restreinte à la mitochondrie, MFN2 est enrichie dans la fraction MAM et joue un rôle dans l'attachement du RE à la mitochondrie (de Brito and Scorrano, 2008).

c) Le transport de calcium

Le RE est le site de stockage du calcium principal dans la cellule. Dans la mitochondrie, l'ion calcium participe à différentes fonctions comme l'activation de la chaîne respiratoire dans des conditions physiologiques ou au déclenchement de l'apoptose, lorsque le taux de calcium intra-mitochondrial est trop élevé. Deux canaux principaux interviennent dans le transfert de calcium du RE vers la mitochondrie : Le canal récepteur IP3R ((inositol 1, 4, 5-trisphosphate) receptor) localisé sur la membrane du RE qui permet la libération du calcium du RE, et VDAC (voltage-dépendant anion-selective channel protein 1) un canal d'entrée de calcium localisé à la MME. Le calcium est ensuite transféré vers la matrice mitochondriale via le canal MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter) localisé dans la MMI. A noter que la protéine chaperonne GRP75 permet de coupler les canaux VDAC et IP3R (Bononi et al., 2012; Marchi et al., 2018). L'un des premiers rôles du calcium intra-mitochondrial est d'activer des enzymes calcium-dépendantes du cycle de Krebs, comme la pyruvate deshydrogenase, l' α -cétoglutarate deshydrogenase et l'isocitrate deshydrogenase. Donc une augmentation relative de la concentration de calcium intra-mitochondrial augmente la production d'ATP. Mais un excès de calcium intra-mitochondrial aboutira à l'apoptose par ouverture du pore de transition mitochondrial (Permeability Transition Pore - PTP) (Rizzuto et al., 2012).

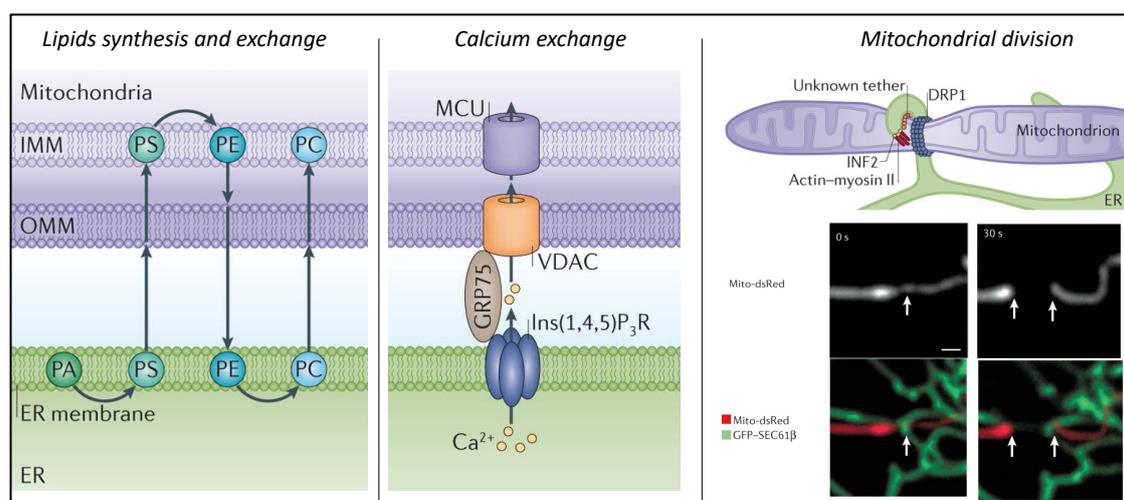


Figure 11: Principales fonctions recensées des MAM : zones de contact entre RE et mitochondrie. A gauche, la synthèse et l'échange de lipides. PA = acide phosphatidique, PS = phosphatidylsérine, PE = phosphatidylethanolamine, PC = phosphatidylcholine. Au centre, le transport du calcium depuis le RE vers la mitochondrie grâce aux canaux IP3R = (inositol

1, 4, 5-trisphosphate) receptor, VDAC = voltage-dependant anion-selective channel protein 1, MCU= Mitochondrial Calcium Uniporter et à la protéine GRP75. A droite, la division mitochondriale. Chez les mammifères, INF2 (Inverted Formin-2), actin et myosine II sont des candidats pour amorcer la constriction de la mitochondrie par le RE. La protéine DRP1 est ensuite recrutée pour permettre la fission mitochondriale. En dessous : image de microscopie à fluorescence de cellules exprimant Mito-dsRed (en gris au-dessus, en rouge en dessous) et GFP-SEC61b (RE en vert). Les tubules du RE délimitent la zone de constriction et de fission. Modifié à partir de (Phillips and Voeltz, 2016a).

Outre ces fonctions principales, les MAM se sont révélées être impliquées dans le métabolisme, l'inflammation et de multiples pathologies mitochondriales (Fig.12). Brièvement, ces zones sont à un carrefour métabolique au centre de plusieurs voies de signalisation, notamment en participant à l'homéostasie du glucose, suggérant qu'elles pourraient être liées à des pathologies métaboliques (Rieusset, 2018). En effet, le diabète de type 2 est caractérisé par une insulino-résistance et une dysfonction mitochondriale du muscle squelettique. Une inhibition de MFN2 chez la souris induit une rupture de communication entre le RE et mitochondrie et une insulino-résistance dans le foie et le muscle squelettique, suggérant que les MAMs sont nécessaires à la régulation de l'homéostasie du glucose et à la signalisation d'insuline (Sebastián et al., 2012). Les MAM ont également un rôle dans l'inflammation et en particulier dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor protein 3) (Missiroli et al., 2018).

Table 2 Human diseases associated with MAM proteins. (abbreviations defined in text).		
Disease	Protein	Function
Alzheimer's disease	Presenilin	β -Amyloid production
Alzheimer's disease	DRP1	Mitochondrial fission
Batten's disease	CLN1	Palmitoylation
Charcot-Marie Tooth	MFN2	Mitochondrial fusion
Dominant optic atrophy	OPA1	Mitochondrial fusion
Insulin resistance	MFN2	Mitochondrial fusion
Insulin resistance	Akt	Glucose metabolism
Insulin resistance	mTORC	Glucose metabolism
Parkinson's disease	Parkin	Ubiquitination
Parkinson's disease	PINK	Protein kinase
Parkinson's disease	MFN2	Mitochondrial fusion
Parkinson's disease	DRP1	Mitochondrial fission
Parkinson's disease	Synuclein	?
Pseudoxanthoma elasticum	ABCC6	Apoptosis
Pulmonary hypertension	Nogo-B	Apoptosis
Viral infections	Viral proteins	Infection

Figure 12: Tableau présentant les pathologies associées à des protéines localisées dans les MAM en lien avec leur fonction cellulaire (Vance, 2014a).

4. Mécanismes d'import vers la mitochondrie et le RE

Toutes les protéines, sauf les 13 codées par la mitochondrie, sont codées par le génome nucléaire. Synthétisées au niveau du cytoplasme, elles doivent ensuite rejoindre leur localisation finale au sein de la cellule et pour plus de la moitié d'entre elles, traverser au moins une membrane. Qu'elles soient membranaires, sécrétées ou adressées à un organe en particulier, les protéines sont guidées par de petites séquences d'adressage, souvent présentes au niveau de leur extrémité N-terminale de la protéine naissante. Cependant, certains signaux peuvent être caractérisés d'« ambigus », et adresser une protéine dans plusieurs organites comme cela peut être le cas pour la mitochondrie et le RE.

4.1. Import vers la mitochondrie

Les mitochondries sont composées de quelques 1500 protéines codées par le génome nucléaire, plus 13 codées par le génome mitochondrial (Calvo and Mootha, 2010). Synthétisées dans le cytoplasme, elles doivent ensuite être importées et distribuées dans les différents compartiments de la mitochondrie. Ce processus est médié par des systèmes de translocation coordonnés localisés dans les MME et MMI, et capable de reconnaître les signaux d'adressage : notamment le complexe TOM (Translocase of Outer Mitochondrial Membrane) pour la membrane externe et TIM (Translocase of Inner Mitochondrial Membrane) pour la membrane interne (Chacinska et al., 2009). Les protéines précurseurs peuvent porter plusieurs types de signal d'adressage : des signaux de ciblage internes ou une pré-séquence en position N-terminale (N-ter). Ces signaux déterminent le mode d'import et la localisation de la protéine mature.

4.1.1. Les signaux d'adressage mitochondrial

Deux propriétés conditionnent l'import des précurseurs dans la mitochondrie : la présence d'un signal d'adressage reconnaissable par les récepteurs et une conformation dépliée pour permettre leur transport au travers des canaux d'import. Il existe de multiples processus capables de réguler l'import des protéines mitochondriales comme la liaison d'un métabolite sur la protéine précurseur, la phosphorylation de la protéine précurseur ou le clivage de la pré-séquence dans le cytoplasme (Harbauer et al., 2014).

Le mécanisme d'import des protéines mitochondriales le plus fréquent implique une pré-séquence clivable, nommée Mitochondrial Targeting Sequence (MTS) qui permet l'adressage des protéines vers la matrice mitochondriale, la MMI et l'espace inter-membranaire (Hansen and Herrmann, 2019). Cette MTS est située en position amino terminale de la protéine, et généralement constituée de 20 à 40 acides aminés, mais pouvant aller jusqu'à 100 aa. Elle est composée d'une hélice α avec des résidus chargés positivement d'un côté et de résidus hydrophobes non chargés de l'autre (Kunze and Berger, 2015). L'espacement et les positions des résidus cationiques sont critiques pour la fonctionnalité du signal (Avadhani et al., 2011a). Certaines protéines seront adressées à la MMI ou dans l'espace intermembranaire selon les pré-séquences. Celles destinées à la matrice verront leur MTS clivée par une peptidase mitochondriale, (Mitochondrial Processing Peptidase, MPP) une fois importées (Doyle et al., 2013; Omura, 1998).

Il existe également des mécanismes d'import mitochondrial impliquant des signaux de ciblage non clivables permettant leur ancrage aux MME ou MMI, ou leur localisation dans l'espace inter-membranaire. Ainsi certaines protéines possédant un signal d'adressage à l'extrémité C-terminale pourront être dirigées à la MME. Enfin, de petites protéines riches en cystéine seront adressées à l'espace intermembranaire. A noter que beaucoup de protéines sont ancrées à la MME grâce à des hélices α (Calvo and Mootha, 2010).

Des logiciels ont été développés pour prédire *in silico* un signal d'adressage clivable comme TargetP (Almagro Armenteros et al., 2019), iPSORT (Bannai et al., 2002), Predotar (Small et al., 2004), MitoPred (Guda et al., 2004), MitoProt (Claros and Vincens, 1996). Ils permettent la prédiction de peptides signaux, des signaux d'adressage mitochondrial et la détection des sites de clivage. Les principales limites de ces outils sont un taux important de prédiction de « faux positifs ». Ils ne permettent pas non plus de détecter toutes les protéines mitochondriales, car ils se basent uniquement sur la pré-séquence clivable et qu'il existe d'autres mécanismes d'import. A titre d'exemple, en choisissant les paramètres les plus stringents, Target P a un taux de faux positif de 3% mais ne détecte que 20% des protéines mitochondriales (Almagro Armenteros et al., 2019). Ainsi, utilisés seuls, ces logiciels présentent une faible spécificité et une faible sensibilité, mais leurs applications peut motiver une analyse expérimentale (Gaston et al., 2009).

4.1.2. Les mécanismes d'import mitochondrial

Le ciblage post-traductionnel est le processus le plus fréquent. Les protéines sont dirigées vers la MME grâce à différents processus de ciblage, impliquant des protéines de liaison aux précurseurs, telles que l'ubiquiline (Fig.13). Les molécules chaperonnes cytosoliques des familles Hsp70 et Hsp90 sont également indispensables afin de prévenir l'agrégation des protéines et de maintenir ces dernières dans une conformation nécessaire pour l'import. Un second mécanisme consiste en l'import co-traductionnel et est réalisé par un ribosome attaché à la MME, couplant la traduction d'une protéine à son import (Hansen and Herrmann, 2019).

Le complexe TOM, localisé sur la MME, reconnaît les protéines précurseurs et permet leur insertion à la membrane externe et leur translocation à travers cette membrane. C'est un complexe multimérique de 450kDa qui comprend sept sous-unités : Tom70, Tom40, Tom22, Tom20, Tom7, Tom6 et Tom5. II. Les protéines précurseurs possédant une préséquence se fixent au récepteur Tom20/Tom22, et celles avec une séquence de ciblage interne se fixent au récepteur Tom70 (Hansen and Herrmann, 2019). Les protéines sont ensuite présentées au canal du complexe TOM, aussi nommé complexe GIP (General Import Pore). Il est composé de Tom40 et maintenu par des interactions avec Tom22, formant 2 à 3 pores. Certaines protéines accessoires de ce complexe telles que Tom5, Tom6 et Tom7 jouent également un rôle dans la stabilité et l'organisation du complexe TOM (Truscott et al., 2003). La translocation des pré-protéines à travers la membrane externe est indépendante du potentiel de membrane et de l'ATP. Les protéines précurseurs sont ensuite transférées dans l'espace intermembranaire ou insérées dans la MME (Paschen and Neupert, 2001).

Une fois dans l'espace intermembranaire, le complexe TOM coopère avec le complexe TIM pour permettre l'insertion des protéines à la MMI ou leur translocation dans la matrice. Ceci implique deux translocases distinctes:

les complexes TIM23 et TIM22. La translocation des préprotéines à travers les deux membranes a lieu à des sites où les membranes sont en contacts étroits. Les préprotéines adressées à la matrice ou à la MMI, qui possèdent un signal en N-ter, empruntent le complexe TIM23, composé de Tim23, Tim17, Tim50 et Tim44. C'est un canal protéique organisé en tétramères stabilisés par Tim23 du côté espace intermembranaire et de Tim44 côté matriciel (Hansen and Herrmann, 2019). Tim44 recrute l'Hsp70 mitochondriale (mtHsp70) soluble de façon ATP dépendante, et régulée par le facteur Mge1p. Les protéines avec préséquence sont reconnues par Tim50 et sont transloquées à travers la membrane interne grâce à un pore aqueux formé du domaine transmembranaire de Tim23 et de Tim17. La translocation de la pré-protéine est ensuite guidée par hydrolyse de l'ATP grâce à mtHsp70, Tim44 et Mge1, localisés au niveau de la partie matricielle de TIM23 (Pfanner and Meijer, 1997). Ensemble, elles forment un moteur moléculaire ATP-dépendant appelé PAM (Presequence translocase-Associated Motor). Pour les préprotéines destinées à la matrice, la séquence MTS est ensuite clivée par une peptidase MMP (Mitochondrial Processing Peptidase). Enfin, les protéines adopteront leur conformation définitive grâce aux chaperones mtHSP70 et mtHSP10/60.

Les protéines avec des séquences de ciblage non clivables sont, quant à elles, reconnues par TIM22. Ce complexe, qui permet l'intégration des pré-protéines à la membrane interne, est constitué de Tim22, de Tim18 et d'une protéine accessoire Tim54 (Truscott et al., 2003). Le complexe TIM22 interagit avec trois petites protéines de l'espace intermembranaire : Tim9, Tim10 et Tim12 organisées en complexes hétéro-hexamériques. Après passage de la membrane externe grâce à Tom70, les pré-protéines interagissent avec le complexe Tom9/Tom10 dans l'espace intermembranaire, tout en restant associées avec le complexe TOM. Elles sont ensuite prises en charge par l'hexamère formé de Tim9/Tim10/Tim12, en interaction avec le complexe TIM22. L'association avec TIM22 permet la libération des protéines précurseurs du complexe TOM, et leur intégration à la MMI.

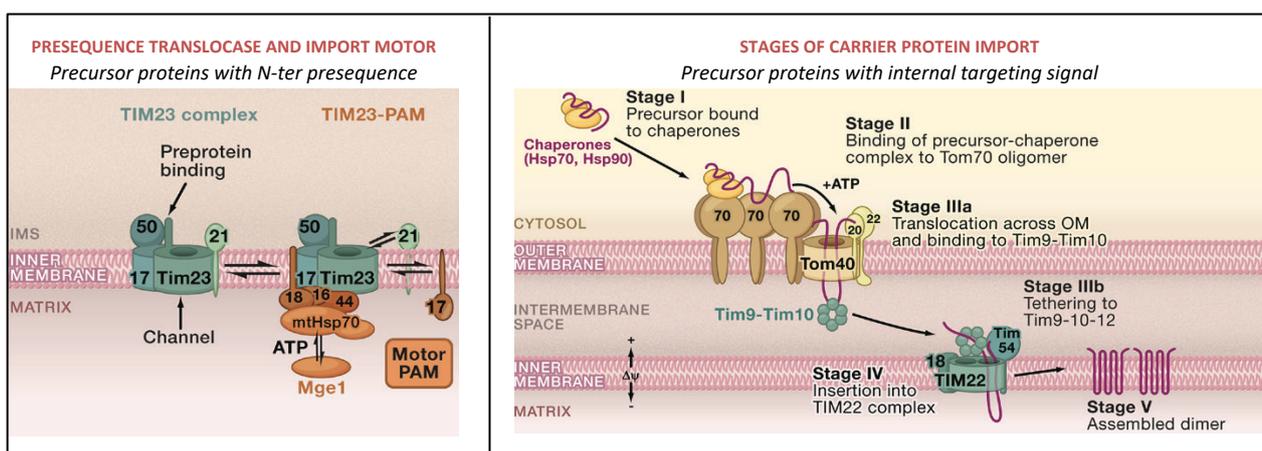


Figure 13: Principales translocases permettant l'import des pré-protéines dans la membrane interne et la matrice mitochondriale. (A gauche) Différentes conformations du complexe TIM23. Le complexe TIM23 seul peut insérer les préprotéines à la membrane interne (bleu). Le complexe TIM23, associé au moteur PAM (en orange) se lie avec mtHsp70 qui est en contact avec la pré-protéine et dont la fonction est régulée par Pam16-Pam18, Tim44, Pam17 et le facteur d'échange des nucléotide Mge1. (A droite) La voie des transporteurs à la membrane interne. Des chaperones cytosoliques prennent en charge la pré-protéine jusqu'au récepteur Tom70. La pré-protéine traverse la membrane externe grâce à Tom40 en conformation de boucle et interagit avec Tim9/Tim10 de l'espace inter-membranaire qui la guide vers le complexe TIM22 qui

permet son ancrage à la membrane interne avant son assemblage en une protéine mature. Adapté de (Chacinska et al., 2009).

Il existe également d'autres voies nommées MIA ou SAM, impliquées dans l'import des protéines respectivement dans l'espace intermembranaire et à la MME. La machinerie MIA (Mitochondrial intermembrane space Import and Assembly) est responsable de l'import des préprotéines avec motifs cystéine dans l'espace intermembranaire. Après la translocation à travers la MME via le complexe TOM, le récepteur Mia40 lie le précurseur par une liaison disulfide. Erv1, une oxydase, s'associe alors avec Mia40 pour oxyder la protéine précurseur qui s'assemble ensuite en oligomères. Le complexe SAM (Sorting and Assembling Machinery) permet l'insertion des protéines avec un signal interne ou avec une conformation de tonneau β à la membrane MME. Dans le second cas, la pré-protéine est prise en charge par le complexe TOM et une fois dans l'espace intermembranaire, des protéines chaperonnes (les complexes Tim9/Tim10 ou Tim8/Tim13) permettent de la retransférer au complexe SAM. Les sous-unités Sam50 et Sam35 induisent ensuite son intégration à la MME. Un autre complexe de la MMI, nommé OXA1 permet l'exportation des protéines codées par le génome mitochondrial et un certain nombre de pré-protéines codées par le génome nucléaire depuis la matrice vers la MMI. Ce processus nécessite, en revanche, que les protéines soient d'abord importées vers la matrice grâce aux complexes TOM et TIM (Bauer et al., 2000). La multiplicité des signaux et des mécanismes d'import illustre la diversité des protéines qui composent la structure mitochondriale.

4.2. Import vers le réticulum endoplasmique

Plus de 30% des gènes humains codent pour des protéines destinées au microenvironnement extracellulaire, à la membrane plasmique et aux composants de la voie sécrétoire (Uhlen et al., 2015). Ces protéines doivent en premier lieu être transportées par des membranes comme le RE. Plusieurs processus de translocation sont possibles (Dudek et al., 2015) : si la protéine possède une séquence N-terminale hydrophobe et linéaire, elle s'orientera vers le RE. Cette séquence, nommée « peptide signal » est responsable de cet aiguillage dit co-traductionnel. D'autres séquences participent également à un aiguillage post-traductionnel, ce sont des « peptides de destination ». Il existe en général quelques étapes clefs nécessaires à la translocation depuis le cytosol : la reconnaissance du peptide signal par le complexe SRP (Signal Recognition Particle) et le ciblage à la membrane de destination. La translocation à travers une membrane, ou son intégration dans une membrane, nécessite généralement une dépense d'énergie sous forme d'ATP, de GTP ou tout autre force proto-motrice, et finalement la libération, le repliement et la maturation de la protéine.

Pour l'import au RE, il existe deux mécanismes principaux de translocation : la translocation co-traductionnelle pour laquelle la translocation à travers le canal est effectuée simultanément à la synthèse protéique, ou la translocation post-traductionnelle qui transmet une chaîne polypeptidique déjà complètement synthétisée à la membrane. La première utilise l'énergie de la traduction de l'ARNm par les ribosomes pour permettre la translocation des protéines à travers la membrane du RE.

4.2.1. Les signaux d'adressage au réticulum endoplasmique

Les signaux d'adressage du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie présentent de nombreuses similitudes. Souvent présents à l'extrémité N-terminale, ils sont appelés peptide signal (SP=Signal Peptide) ou séquence signal. S'ils peuvent être très hétérogènes dans leur longueur et leur composition en acides aminés, ces peptides signaux sont souvent de nature hydrophobe, formant une hélice α assez courte (de 8 à 12 acides aminés). Un autre type de signal consiste en une séquence en N-ter non clivée, nommé Signal Anchor (SA). Il se caractérise par un domaine transmembranaire d'au moins 20 acides aminés hydrophobes. Les protéines membranaires dites « tail-anchored » constituent un troisième type de signal possible. Elles possèdent une région hydrophobe transmembranaire à leur extrémité C-terminale qui a pour rôle à la fois de peptide signal et de les ancrer à la membrane.

Une fois les protéines importées dans la lumière du RE, des signaux secondaires localisés au sein des protéines déterminent leur destination. Après translocation, les signaux sont le plus souvent clivés par le complexe peptidase signal (SPC = Signal Peptidase Complex). Certaines protéines restent dans le réticulum tandis que d'autres sont adressées au Golgi, aux lysosomes, à la membrane plasmique ou sont sécrétées à l'extérieur de la cellule. Les protéines résidentes du RE peuvent être localisées dans la lumière ou dans la membrane du RE selon l'expression des signaux d'arrêt de transfert. Une étude portant sur la protéine CYP2D6 montre que l'affinité du signal de ciblage RE pour le SRP est extrêmement dépendante de l'hydrophobicité de ce signal. En somme, plus les séquences de ciblage sont hydrophobes, plus elles sont capables de se lier au SRP et plus les protéines se dirigent vers le RE (Avadhani et al., 2011a).

4.2.2. Translocation co-traductionnelle vers le RE

Le mécanisme de translocation co-traductionnelle débute avec la traduction de l'ARNm dans le cytosol grâce aux ribosomes (Fig.14). Une fois le signal d'adressage hydrophobe synthétisé, il est reconnu par un complexe ribonucléoprotéique nommé SRP simultanément à la continuité de la synthèse protéique. L'interaction avec SRP se fait principalement par des liaisons hydrophobes (Kunze and Berger, 2015). Le rôle de ce complexe, possédant une activité GTPasique, est la reconnaissance du peptide signal grâce à un domaine S capable de lier les peptides signaux.

Le SRP possède un domaine Alu qui forme une structure allongée coudée. Après la reconnaissance du signal par le domaine S, la fixation du domaine Alu permet de ralentir l'élongation de la chaîne polypeptidique. Le complexe formé par le SRP et le complexe chaîne naissante-ribosome (RNC = Ribosome-Nascent chain Complex) cible ensuite la membrane du RE pour que le SRP se lie à son récepteur. Le SR (Signal recognition particle Receptor), localisé au niveau de la membrane du RE est constitué de 2 sous-unités : la sous-unité α périphérique possédant un domaine GTPase, et la sous-unité β , moins importante dans ce mécanisme, qui existe également sous la forme d'une protéine transmembranaire (Nyathi et al., 2013).

L'hydrolyse du GTP, responsable de l'impulsion de la protéine naissante vers le tunnel de sortie du ribosome, induit également la libération du complexe SRP. S'ensuit la fixation de la protéine au canal de translocation composé principalement du complexe Sec61p. Il forme un pore au travers la membrane, permettant le passage des protéines dans la lumière du RE (Matlack et al., 1998). Hétérotrimérique, le complexe Sec61p est composé de Sec61 α formant le canal, et de deux petites sous-unités périphériques Sec61 β et Sec61 γ . Plusieurs facteurs accessoires, présents au niveau de la membrane du RE sont recrutés au translocon pour assister le canal Sec 61 (TRAP = Translocon-Associated Membrane ou TRAM = Translocating chain Associated Membrane protein) ou pour effectuer des modifications post-traductionnelles du peptide signal avant qu'il ne soit clivé. La protéine Bip est une molécule chaperonne qui obstrue le translocon lorsqu'aucune protéine ne se présente (Zimmermann et al., 2011). Le translocon forme un pore passif dans la membrane du RE. Après la reconnaissance et l'ouverture du pore, les protéines transmembranaires seront intégrées à la membrane. En revanche, les protéines sécrétées seront transloquées à travers la membrane grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse du GTP lors de la traduction. Enfin, une peptidase (SPC = Signal Peptidase Complex) coupe le peptide signal et permet le repliement final de la protéine afin d'adopter sa configuration finale dans la lumière du RE.

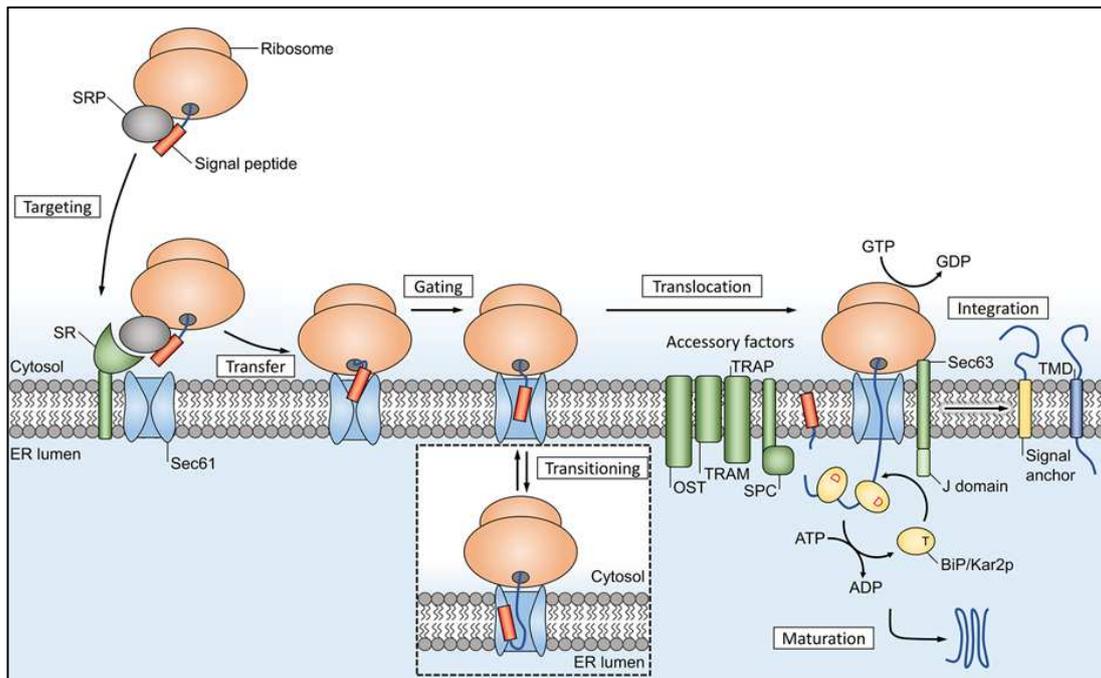


Figure 14: La translocation co-traductionnelle dépendante de SRP. La synthèse ribosomale de protéines est couplée à la translocation, qui protège le peptide et utilise l'énergie de l'élongation de chaîne comme une force motrice. Le canal facilite l'intégration à la membrane des domaines transmembranaires hydrophobes. Les facteurs accessoires résident dans l'environnement de la membrane et sont recrutés pour assister la fonction du translocon. Le complexe peptidase clive le peptide signal de la protéine mature alors que le signal non clivé maintient et ancre la protéine dans la membrane et agit comme un domaine transmembranaire. Modifié à partir de (Van Puyenbroeck and Vermeire, 2018).

4.2.3. Translocation post-traductionnelle vers le RE

Bien que la translocation co-traductionnelle des protéines vers le RE soit le mécanisme le plus fréquent, il existe également une translocation dite post-traductionnelle (Fig.15). Les protéines avec une séquence signal

hydrophobe contournent le SRP et sont déplacées à travers le canal uniquement après la traduction. Ce processus est médié par l'association du canal Sec61 avec un autre complexe protéique membranaire, composé de Sec62/Sec63.

Après sa traduction, la protéine est associée à une molécule chaperonne cytosolique Hsp70 afin de maintenir une conformation nécessaire à la translocation ATP dépendante et une autre Hsp40, modulant l'activité ATP-ase de Hsp-70. En effet, les canaux de translocation sont étroits et ne permettent le passage de protéines avec une structure secondaire limitée. La calmoduline est une autre protéine cytosolique qui joue un rôle de chaperonne en se liant d'une manière calcium-dépendante au signal peptide, puis au domaine TPR de Sec72 via son extrémité C-ter. La protéine s'insère dans le canal Sec61 ouvert au niveau de la face cytosolique. Simultanément, la protéine Bip se fixe à la protéine afin de diriger la protéine vers la face luminale du RE. Après le passage au travers du complexe d'importation, les protéines Bip se détachent par l'hydrolyse de l'ATP en ADP (Wu et al., 2019).

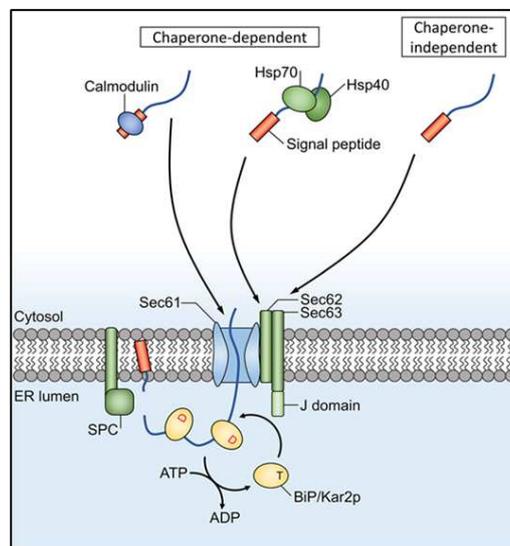


Figure 15: La translocation post-traductionnelle vers le RE. La calmoduline lie le peptide signal et est ciblée à Sec61 car Sec61 contient un site de liaison à un peptide signal. Des chaperonnes cytosoliques Hsp retiennent les protéines cytosoliques dans une conformation nécessaire à la translocation et cible Sec62/Sec63. D'autres mécanismes, indépendants des chaperonnes sont également possibles. Le domaine J de Sec63 convertit Bip dans un état ayant une haute affinité pour la liaison de protéine. Bip guide ensuite la translocation post-traductionnelle. Modifié à partir de (Van Puyenbroeck and Vermeire, 2018).

4.2.4. Exemples de double-adressage des protéines vers la mitochondrie et le RE

La caractéristique de double localisation, ou double distribution, des protéines signifie que même si elles dérivent d'un seul gène et transcrite, une protéine peut être localisée dans plusieurs organites. Il est intéressant de noter que ces protéines peuvent effectuer des activités et des fonctions identiques ou distinctes à chaque emplacement (Yogev and Pines, 2011). Dans ce sens, environ 15% des protéines mitochondriales sont localisées à la fois à la mitochondrie et dans un autre organite. Ce double-adressage peut s'effectuer via de nombreux mécanismes, dont l'épissage alternatif permettant de produire des protéines distinctes (Calvo and Mootha, 2010). Certaines protéines peuvent également avoir une séquence de ciblage dite ambiguë qui peut être reconnue par plusieurs

organites. Dans ce cas, la localisation des protéines sera déterminée par « compétition » pour le signal entre les organites.

Prenons l'exemple de la superoxyde dismutase contenant du fer (LpSOD). Cette protéine contient une pré-séquence ambiguë en N-terminal qui héberge à la fois un peptide signal RE faible et un signal de ciblage mitochondrial. Si le polypeptide synthétisé se lie à la particule de reconnaissance de signal (SRP), il sera importé dans le RE par co-traduction. En revanche, si le polypeptide se lie au complexe associé au polypeptide naissant (NAC), la protéine sera importée après traduction dans la mitochondrie (Bodył and Mackiewicz, 2007a). CYP2B1 est un autre exemple de protéine localisée à la mitochondrie et au RE, grâce à un signal bipartite. Cependant, dans ce cas, c'est la phosphorylation de la sérine en position 128 par la protéine kinase A (PKA), qui permet de moduler l'adressage en réduisant l'affinité de la protéine pour le SRP et donc l'adressage vers le RE, au profit d'un adressage à la mitochondrie. Les niveaux intracellulaires d'AMPc, modulateur de la PKA, peuvent de ce fait modifier l'équilibre de distribution de CYP2B1 entre les deux compartiments cellulaires (Avadhani et al., 2011b).

5. Identification de CT55 : un nouveau régulateur de l'ADNmt ?

Comme nous l'avons décrit, de nombreux mécanismes de régulation de la quantité d'ADNmt sont connus. Néanmoins, la chaîne de régulations aboutissant au contrôle du nombre de copies d'ADNmt reste très impécis et pavée de questions. Ainsi, l'objectif de mon travail de thèse a consisté à découvrir et caractériser de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans la régulation quantitative du maintien du génome mitochondrial.

Pour cela, nous avons utilisé la base de données de NCI-60 et l'outil d'analyse CellMiner (<https://discover.nci.nih.gov/cellminer/>). Depuis la fin des années 1980, l'Institut National du Cancer (NCI - National Cancer Institut) aux USA, a développé un programme de caractérisation extensive de 60 lignées cellulaires tumorales humaines, dans le but de caractériser exhaustivement ces lignées cellulaires et d'identifier des composés permettant une inhibition de leur croissance. Dans ce sens, une approche multi-OMICs a été entreprise, et plus de 3000 molécules par an ont été testées pour leur activité anti-cancéreuse sur ces 60 lignées cellulaires. Toutes proviennent de cancers issus de 9 tissus différents : système nerveux central (SNC), peau, sang, poumon, colon, ovaires, sein, prostate et rein. Ces lignées sont parmi les plus largement utilisées dans les laboratoires de recherche et les mieux caractérisées tant au niveau de leurs mutations, que des SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), ou des STR (*Short Tandem Repeat*). De fait, aujourd'hui nous avons accès à l'expression de quelques 22000 gènes et à l'activité de plus de 200000 drogues provenant de ces 60 lignées, permettant éventuellement de sélectionner des composés qui pourraient interagir avec une cible spécifique (Shoemaker, 2006). Afin de faciliter l'exploitation des données de NCI-60, des outils comme CellMiner™ ont été créés. La base de données et son outil d'analyse permettent d'intégrer les données pharmacologiques et moléculaires des 60 lignées cancéreuses (Reinhold et al., 2012; Shankavaram et al., 2009). En couplant les données de génomique, transcriptomique et protéomiques à l'effet de drogues. Néanmoins aucune donnée de NCI-60 ne concerne le génome mitochondrial.

Dans l'objectif d'identifier de nouveaux régulateurs impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome mitochondrial, nous avons évalué le nombre de copies d'ADNmt dans les 60 lignées cellulaires de NCI-60 (Fig.16). Puis, l'analyse du transcriptome de la base de données NCI-60 via l'outil de comparaison « Pattern Comparison » de CellMiner (<https://discover.nci.nih.gov/cellminer/>) a permis d'identifier 946 et 900 gènes respectivement corrélés positivement et négativement avec le nombre de copies d'ADNmt.

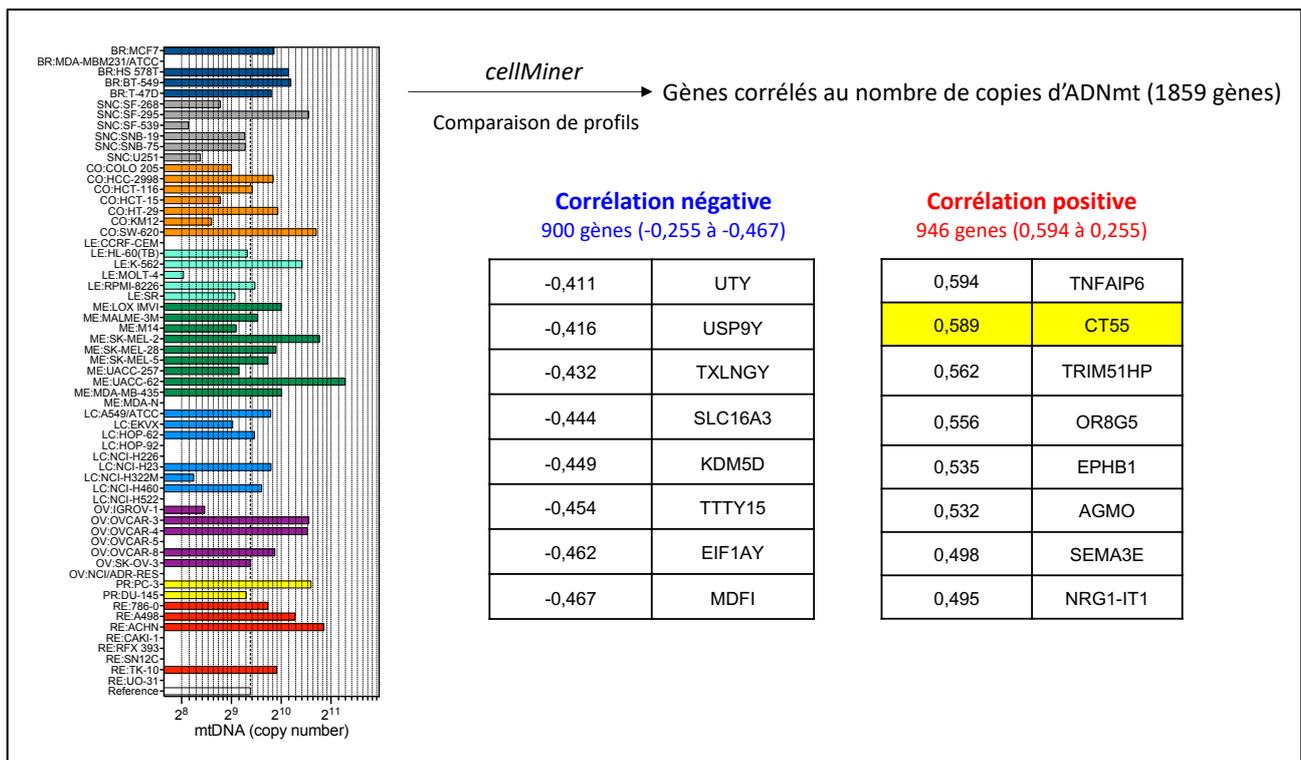


Figure 16 : Schéma de la stratégie d'identification de la corrélation entre CT55 et l'ADNmt. A gauche : quantification du nombre de copies d'ADNmt dans les 60 lignées cellulaires de NCI60. Les lignées sont organisées par tissus, chaque couleur représentant un tissu. L'analyse de corrélation de l'expression des gènes est effectuée grâce à l'outil « Pattern comparison » de la base de données CellMiner. A droite : Représentation des 11 gènes les plus corrélés négativement et positivement avec la quantité d'ADNmt. CT55 est le second gène le plus corrélé positivement à la quantité d'ADNmt (0,589).

Parmi les gènes corrélés positivement, le second facteur de corrélation le plus important (0,589) est CT55. Dans la bibliographie accessible sur PUBMED, très peu de données concernent CT55 et aucune ne permet de l'impliquer dans le maintien du génome mitochondrial. CT55 se distingue en revanche par son profil d'expression unique puisque son expression est très particulière et loin d'être ubiquitaire, comme on pourrait l'attendre d'une protéine ayant une fonction mitochondriale. En effet, CT55 est uniquement exprimé dans les testicules et dans certains cancers, une caractéristique majeure de la famille à laquelle il appartient : les *Cancer/Testis Antigen*. Compte-tenu du peu d'informations disponibles sur les gènes CTAs en lien avec la mitochondrie, nous nous sommes donné comme objectif de cette thèse de caractériser les fonctions de CT55, en particulier en lien avec son implication potentielle dans la régulation du maintien quantitatif du génome mitochondrial.

6. CT55 : un membre de la famille des *Cancer/Testis Antigens (CTA)*

6.1. Les CTA

Le cancer est la cause de près d'un décès sur six dans le monde selon l'Organisation Mondiale de la Santé, avec une offre de médicaments qui reste loin de répondre aux besoins actuels. Néanmoins, l'immunothérapie s'est développée ces dernières années avec pour objectifs d'utiliser le potentiel important de la réponse immunitaire pour combattre les cellules cancéreuses, et ceci avec une condition majeure : identifier des cibles spécifiques des tumeurs. Un premier antigène original a été cloné à partir d'un patient atteint de mélanome en 1991. Six ans plus tard, toute une famille d'antigènes cancéreux a été identifiée dans des sérums de patients, avec une caractéristique très particulière, celle d'être exprimés uniquement dans les testicules et certains tissus cancéreux. Le nom de « *Cancer/Testis Antigens (CTA)* » leur a été attribué pour la première fois en 1997 (Chen et al., 1997). Aujourd'hui, il existe 276 CTA répertoriés en plus de 70 familles dans la base de données CTDatabase (<http://www.cta.incc.br/>) (Almeida et al., 2009), dont fait partie CT55.

Les CTA sont classés en deux catégories : les X-CTA et les non X-CTA. Les premiers, dont fait partie CT55, notre gène d'intérêt, sont codés par le chromosome X et constituent plus de la moitié des CTA connus à ce jour. Concernant leurs fonctions dans les testicules, ils participent à différentes étapes de la spermatogenèse. En cancérologie, un lien étroit existe entre l'expression des CTA et l'agressivité tumorale (Andrade et al., 2008; Maine et al., 2016). Leur profil d'expression particulier suggère que les CTA participent à des processus communs entre spermatogenèse et développement des cellules cancéreuses. Bien que peu connues, les fonctions des CTA semblent être impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la maturation des acrosomes lors de la spermatogenèse (Yanagi et al., 2017). La forte expression de ces protéines dans les cancers et leur absence dans les tissus somatiques normaux, font de cette famille des cibles idéales pour l'immunothérapie.

6.1.1. Les CTA : des cibles de choix pour l'immunothérapie

L'immunothérapie consiste en la stimulation du système immunitaire dans le but de reconnaître et détruire les cellules tumorales. Son objectif est donc d'identifier des cibles immunogènes et spécifiques aux tissus cancéreux pour le développement de potentiels vaccins anticancéreux. Ainsi, les CTA ont très tôt été considérés comme des cibles immunothérapeutiques de choix, de par leur absence d'expression dans les cellules somatiques. Plusieurs essais cliniques de phase II et III ont été lancés sur les premiers CTA identifiés : MAGE-A3 et NY-ESO-1, mais pour l'instant sans succès. Néanmoins, d'autres essais cliniques se multiplient aujourd'hui sur de nouvelles pistes thérapeutiques : le ciblage d'autres CTA, l'association de plusieurs CTA comme cibles pour une meilleure spécificité, et la combinaison de ces immunothérapies avec les traitements actuels, afin d'augmenter la spécificité thérapeutique, réduire les effets secondaires et prévenir les récives. La revue présentée ci-après, fait état des principaux essais cliniques impliquant des CTA et notamment ceux concernant MAGE-A3 et NY-ESO-1.

Revue : Jade Aurriere, Guy Lenaers, Salim Khiati. Les CTA (cancer/testis antigens) : cibles pour l'immunothérapie des cancers. *Innovations & Thérapeutiques en Oncologie*. 2020;6(2):75-81. doi:10.1684/ito.2020.0205



L'essentiel de l'information
scientifique et médicale

www.jle.com

Le sommaire de ce numéro

<http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/medecine/ito/sommaire.md?type=text.html>



Montrouge, le 01/08/2020

Salim Khiati

Vous trouverez ci-après le tiré à part de votre article au format électronique (pdf) :
Les CTA (cancer/testis antigens) : cibles pour l'immunothérapie descancers

paru dans
2020, Volume 6, Numéro 2

John Libbey Eurotext

Ce tiré à part numérique vous est délivré pour votre propre usage et ne peut être transmis à des tiers qu'à des fins de recherches personnelles ou scientifiques. En aucun cas, il ne doit faire l'objet d'une distribution ou d'une utilisation promotionnelle, commerciale ou publicitaire. Tous droits de reproduction, d'adaptation, de traduction et de diffusion réservés pour tous pays.

© John Libbey Eurotext, 2020

Les CTA (*cancer/testis antigens*) : cibles pour l'immunothérapie des cancers

CTAs (*cancer/testis antigens*): *targets for cancer immunotherapy*

Jade Aurriere
Guy Lenaers
Salim Khiati

Université d'Angers
CHU d'Angers
Institut MitoVasc, Équipe MitoLab
UMR CNRS 6015, Inserm U1083
Rue des Capucins
49933 Angers cedex 9
France
<jade.aurriere@univ-angers.fr>
<guy.lenaers@inserm.fr>
<salim.khiati@univ-angers.fr>

Remerciements et autres mentions :

Financement : Angers Loire Métropole.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

RÉSUMÉ

Alors que les chimiothérapies rencontrent de nombreux écueils comme ceux liés à la spécificité du ciblage, les effets indésirables et le développement de résistances, il devient important d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques du cancer. C'est dans ce cadre que l'immunothérapie a fait son apparition il y a quelques dizaines d'années, avec l'objectif de trouver de nouvelles cibles, qui seront les plus spécifiques possibles, afin d'induire le corps humain à stimuler le système immunitaire pour se défendre par lui-même. Parmi les cibles étudiées, l'une des plus prometteuses est la famille des *cancer/testis antigens* (CTA), codés par une famille d'au moins 276 gènes qui partagent un profil d'expression très particulier. En effet, les CTA sont surexprimés dans de nombreux cancers, alors qu'ils ne sont pas exprimés dans les tissus sains, hormis les testicules, évinçant ainsi les risques d'effets secondaires potentiels lors du ciblage de ces protéines. Ces dernières années, les essais cliniques d'immunothérapies de phase II et III sur les CTA se sont développés, notamment contre *MAGE-A3* ou *NY-ESO-1*. Dans cette revue, nous faisons un tour d'horizon des CTA et expliquons en quoi cette famille est d'un intérêt tout particulier pour l'immunothérapie.

● Mots clés : cancer ; *cancer/testis antigene* ; immunothérapie ; essais cliniques.

ABSTRACT

The use of anticancer drugs is limited by different factors including off-target effects, severe side effects as well as drug resistance. Immunotherapy is a new promising cancer therapy that can overcome all these deleterious factors. Among new targets, cancer/testis antigens (CTAs) have emerged as valid and promising targets for immunotherapy. This family is composed of more than 276 genes, which share a highly unique expression profile, as they are strongly expressed in many cancers but not in healthy tissues, except the testis. Their function is not fully elucidated, and several clinical trials have been conducted, aimed at targeting some CTA members, such as MAGE-A3 and NY-ESO-1. In this review, we provide an overview of the CTA family, and summarize the emergence of immunotherapies targeting these proteins with ongoing clinical trials.

● Key words: cancer; *cancer/testis antigen*; immunotherapy; clinical trials.

Les CTA, une famille unique

L'immunothérapie s'est révélée lors des dernières décennies comme l'une des approches les plus prometteuses dans le traitement du cancer,

développant ainsi le besoin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans ce but, en 1991, van der Bruggen *et al.* ont identifié *MZ2-E*, un antigène spécifique des mélanomes reconnu *in vitro* par des lymphocytes T cytotoxiques [1]. En

Tirés à part : S. Khiati

Pour citer cet article : Aurriere J, Lenaers G, Khiati S. Les CTA (*cancer/testis antigens*) : cibles pour l'immunothérapie des cancers. *Innov Ther Oncol* 2020 ; 6 : 75-81. doi : 10.1684/ito.2020.0205

1997, dans le but d'identifier une grande quantité d'antigènes immunogènes, des sérums de patients cancéreux ont été analysés grâce à la méthode SEREX (*SERological identification of antigens by Recombinant EXpression cloning*). Dans ces sérums, ont été retrouvées des protéines dont un point commun était d'être fortement exprimées dans un grand nombre de cancers et uniquement au niveau du testicule en situation physiologique, d'où leur dénomination proposée pour la première fois : les *cancer/testis antigens* (CTA) [2]. Leur profil d'expression unique n'est pas la seule caractéristique des membres de cette famille qui, bien que de plus en plus étudiée, compte de nouveaux membres dont la fonction est encore non identifiée aujourd'hui.

Caractéristiques et dénomination

Selon leur définition de 1997, les CTA se distinguent par trois caractéristiques communes : ils sont exprimés uniquement dans des cellules germinales mâles dans le testicule, mais pas dans les autres tissus somatiques de l'adulte. Outre le testicule où ils participent activement à la spermatogenèse, les CTA sont également exprimés dans les cellules cancéreuses de différents types histologiques. Enfin, ils sont activés de façon non spécifique dans les tumeurs, autrement dit, un même CTA peut être exprimé dans des tissus cancéreux de différents types histologiques [2]. Avec la découverte d'un plus grand nombre de CTA, les caractéristiques de cette famille ont évolué. Il est désormais évident que l'expression des CTA est un reflet de l'évolution du cancer chez les patients, et ce à plusieurs niveaux. On observe notamment une corrélation entre l'expression des CTA et la capacité des

cellules tumorales à métastaser. Ainsi, les CTA sont peu exprimés dans les lésions néoplasiques bénignes. À titre d'exemple, MAGE-A1, connu aussi sous le nom de MZ2-E, le premier CTA identifié, est exprimé dans 20 % des mélanomes primaires, mais dans 51 % de leurs métastases [3]. De plus, une co-expression de plusieurs CTA est fréquemment observée pour un même type de cancer, ce qui amène au concept que plus une tumeur exprime de CTA différents, plus son pronostic est mauvais pour le patient [4].

Depuis la découverte de la famille des *cancer/testis antigens*, chaque membre possède son propre nom de CTA. Ils sont répertoriés dans une base de données (<http://www.cta.lncc.br/>) disponible en ligne [5]. Ils sont nommés chronologiquement dans l'ordre de leur découverte. Par exemple, MAGE-A1 a été, comme dit précédemment, le premier CTA découvert et, de ce fait, il est nommé CT1. Cependant, on a identifié une grande diversification des gènes codant les CTA au cours de l'évolution, expliquant le fait qu'il existe des familles de CTA pour lesquelles on retrouve de nombreux membres comme la famille MAGE-A, qui possède 11 membres, ou bien encore la famille GAGE, qui possède huit membres. Là encore, chaque membre est nommé suivant l'ordre chronologique de son identification. Enfin, s'il existe plusieurs isoformes pour un même CTA, ils sont distingués par une lettre selon la nomenclature présente sur la *figure 1*.

Classification et régulation

En 2002, seulement 20 CTA étaient identifiés, dont MAGE-A1 (*Melanoma Antigen*), SSX (*Synovial Sarcoma chromosome X breakpoint*) ou GAGE (*Gastric Antigen*) [6].

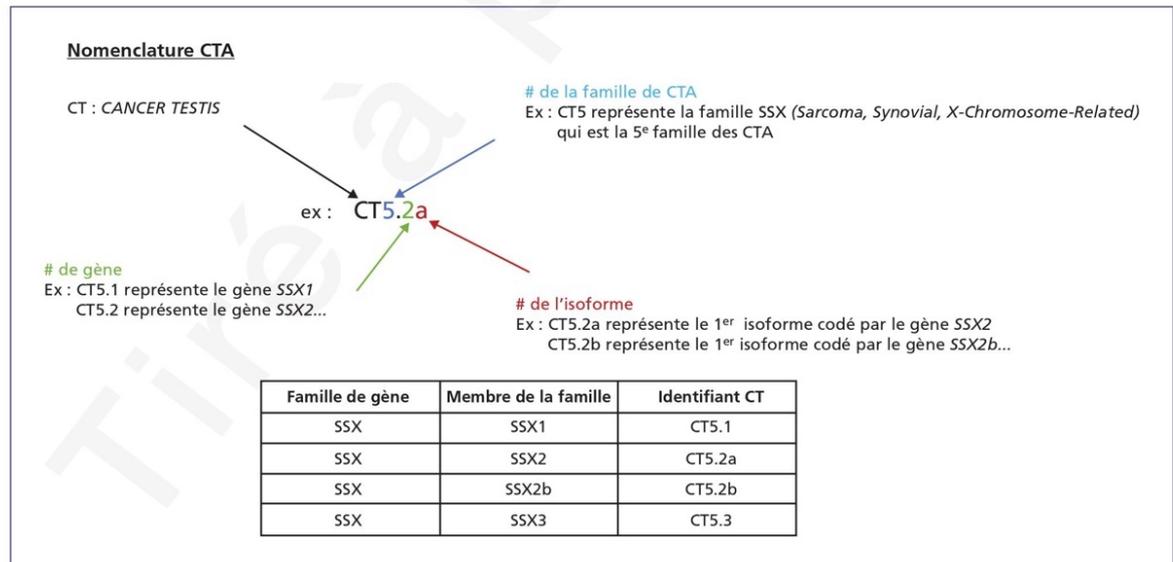


Figure 1. Nomenclature CTA (*cancer/testis antigens*).

Figure 1. The nomenclature of CTAs (*cancer/testis antigens*).

En 2011, 140 CTA avaient été identifiés [7]. À ce jour, on ne dénombre pas moins de 276 gènes codant des CTA et plus de 70 familles, répertoriés dans la CTDATABASE [5], ce qui représente une progression constante d'identification de gènes codant souvent des protéines aux fonctions encore non identifiées.

Les CTA peuvent être classés en deux groupes selon leur localisation chromosomique : les X-CTA portés par le chromosome X, et les non-X-CTA portés par les autosomes. Le premier groupe est le plus abondant ; il constitue plus de la moitié des CTA connus à ce jour. Pendant la spermatogenèse, les X-CTA sont principalement exprimés lors des phases précoces précédant la méiose, tandis que les non-X-CTA sont plutôt exprimés lors des étapes tardives de la spermatogenèse. Récemment, il a été montré que certains CTA peuvent être exprimés dans des tissus somatiques sains, notamment au sein du système nerveux central, ce qui a conduit à proposer une autre classification plus récente. On peut, de ce fait, distinguer, d'une part, les CTA dits *testis-restricted* dont l'expression est, comme leur nom l'indique, restreinte au testicule et, d'autre part, les CTA *testis-selective* ayant une expression dans un ou deux autres tissus, en plus du testicule. Enfin, les CTA *testis/brain-restricted* caractérisent des gènes dont l'expression physiologique est restreinte au testicule et au système nerveux central [8]. Pour ces derniers, leurs fonctions dans les autres tissus sains demeurent peu étudiées.

Aujourd'hui, il apparaît clairement que l'expression des CTA, que ce soit au niveau de la spermatogenèse ou des cancers, est due à une activation épigénétique, c'est-à-dire en absence de toute modification de la séquence nucléotidique de l'ADN [9]. Ainsi, les éléments connus à ce jour qui contrôlent l'expression des CTA sont la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. Il a été montré que certains gènes CTA possédaient des promoteurs méthylés en condition générale et qu'une hypométhylation de ces promoteurs était un facteur nécessaire à l'activation de ces gènes [10]. De plus, il a été montré que l'inhibition des histones désacétylases (HDAC), permettant l'acétylation des histones et donc la décompaction de la chromatine, était nécessaire à l'activation de certains CTA [11]. Il semble donc que les modifications épigénétiques soient cruciales quant à leur expression et donc aux fonctions des CTA durant le développement des cellules cancéreuses.

Fonctions générales

Le profil d'expression unique des CTA pose des questions sur les mécanismes qui rapprochent les processus de spermatogenèse et de tumorigenèse, et les rôles que peuvent jouer ces CTA. En effet, les deux processus partagent des phénotypes communs ou proches parmi lesquels l'invasion, la migration ou encore la différenciation [12]. Il est également intéressant de noter que les cellules germinales et les cellules cancéreuses en développement évoluent dans des micro-environnements

particuliers, notamment par l'utilisation du glucose et/ou du lactate comme source énergétique. Toutes ces caractéristiques nécessitent donc une adaptation des cellules à leur environnement, justifiant leurs profils d'expression particuliers.

Même si le profil d'expression des CTA au cours de la spermatogenèse est bien caractérisé, grâce à des expérimentations d'immunohistochimie sur des coupes de testicule humain, leurs fonctions restent encore à élucider. En revanche, on peut résumer les rôles des CTA durant la spermatogenèse à :

- la régulation du cycle mitotique dans les spermatogonies et les spermatocytes primaires (CTA impliqués : MAGEA1 et NY-ESO-1) [13-15] ;
- l'association avec le cycle méiotique dans les spermatocytes (CTA impliqués : SCP1 et SPO11) [16, 17] ;
- la maturation des acrosomes dans le sperme (CTA impliqué : ADAM2) [18, 19].

Dans le cas des cancers, les fonctions des CTA sont mieux caractérisées et on sait que leur expression est associée au développement tumoral, ce qui laisse entendre que leurs fonctions sont indispensables à la tumorigenèse. Différentes fonctions peuvent être citées : une croissance incontrôlée (CTA impliqués : SSX, CAGE) [20], une induction de l'angiogenèse (CTA impliqué : CAGE) [21], une résistance à l'apoptose (CTA impliqués : MAGE-A, B, C, GAGE, PAGE-4, CAGE) [22, 23], une capacité à migrer et à envahir les autres tissus (CTA impliqués : MAGE-C2, GAGE, XAGE-1, CAGE, CT45A1) [24, 25], et enfin une instabilité génomique (CTA impliqués : FMR1NB, NXF2, SSX2). Chacune de ces caractéristiques est décrite comme essentielle au développement des cellules cancéreuses par Hanahan et Weinberg dans leur revue sur les *Hallmarks of cancer* [26].

« Les CTA sont des cibles thérapeutiques de choix »

Grâce à leur profil d'expression particulier, les CTA sont des cibles thérapeutiques de choix, et donc très prometteuses pour l'élaboration de traitements contre le cancer. Ainsi, au cours de ces deux dernières décennies, des études cliniques concernant des CTA se sont multipliées, notamment dans le cadre de l'immunothérapie, qui se veut être une thérapie ciblée idéale pour le profil d'expression des CTA.

Immunothérapie et essais cliniques de CTA

L'immunothérapie

Le principe de base de l'immunothérapie repose sur le fait que le système immunitaire du patient, une fois stimulé, est capable de reconnaître et détruire les cellules tumorales. Plusieurs stratégies sont envisageables :

- une immunothérapie dite passive ou adoptive qui consiste à injecter directement des effecteurs de l'immunité comme des anticorps (passive) ou des lymphocytes T activés (adoptive) chez des patients ;
- une immunité active mais non spécifique d'antigènes, dans laquelle le but est de restimuler de façon globale tout le système immunitaire des patients ;
- une immunothérapie active qui consiste à réactiver le système immunitaire contre la tumeur *in vivo* grâce à des antigènes ou un groupe d'antigènes [27, 28].

Les essais cliniques actuels qui impliquent des CTA reposent principalement sur deux stratégies : l'immunothérapie adoptive et la vaccination. La première stratégie consiste à réintroduire chez les patients leurs propres cellules T modifiées grâce à des récepteurs de cellules T recombinants spécifiques des épitopes de CTA. La seconde stratégie, les vaccins, permet de stimuler le système immunitaire du patient pour reconnaître les CTA exprimés par la tumeur grâce à l'administration de peptides ou de protéines immunogènes chargés sur des cellules dendritiques ou à l'aide d'adjuvants. Ces deux stratégies ont le même but : augmenter drastiquement et rapidement le nombre de cellules T réactives à la tumeur.

Les essais cliniques impliquant des CTA

Certains CTA ont été particulièrement ciblés, car leur fonction oncogénique est bien définie, comme MAGE-A3 (CT1.3), SSX2 (CT5.2a) et PRAME (CT130). D'autres CTA ont été ciblés car leur capacité immunogène est très importante, comme NY-ESO-1 (CT6.1) et MAGE-A3.

Actuellement, les deux CTA qui ont été l'objet d'études cliniques poussées sont MAGE-A3 et NY-ESO-1 [22, 23], pour lesquels les espoirs de réussite sont élevés. Récemment, d'autres essais cliniques ont impliqué PRAME et SSX, seuls ou en association avec d'autres CTA. Il est important de noter que l'immunogénicité des CTA est variable, or ces quatre CTA ciblés ont la particularité d'être très immunogènes et sont, à ce titre, d'excellents stimulateurs de la réponse immunitaire naturelle.

« Deux CTA ont été l'objet d'études cliniques poussées : MAGE-A3 et NY-ESO-1 »

● MAGE-A3

La famille des MAGE-A (*Melanoma Antigen family A*) regroupe 11 membres tous localisés sur le chromosome X. Ils présentent un domaine d'homologie conservé les caractérisant : le domaine *MAGE Homology Domain* (MHD), dont la fonction est inconnue. MAGE-A3 est exprimé dans les cancers de la peau, dont 60 à 75 % des mélanomes, et dans des cancers du cerveau, du sein, des poumons et des ovaires. De plus, il est l'un des CTA les plus immunogènes connus à ce jour [29]. Ainsi, grâce à son expression dans de multiples cancers, à ses fonctions

oncogéniques bien caractérisées et à sa forte capacité à stimuler les réponses immunitaires, MAGE-A3 est la cible privilégiée de dizaines d'essais cliniques réalisés ces dernières années, dont deux de phase III :

- MAGRIT est une étude en double insu randomisée conduite sur 2 272 patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules. Une protéine recombinante de MAGE-A3, avec un immunostimulant AS15 comme adjuvant, a été administrée par injections intramusculaires répétées, jusqu'à 17 fois sur une période de 27 mois. Ce vaccin n'a pas induit une survie significative des patients sans récurrence traités avec le vaccin MAGE-A3 (60,5 mois), en comparaison avec le groupe placebo (57,9 mois) et l'essai s'est achevé en mars 2014 [30] ;
- DERMA est également un essai clinique de phase III randomisé en double insu qui a utilisé le même vaccin pendant une durée de 28 mois chez des patients atteints de mélanome de stade III exprimant MAGE-A3. Cet essai s'est déroulé dans 31 pays, 263 centres hospitaliers, et a pu comparer *in fine* un groupe de 895 patients qui avait reçu le traitement MAGE-A3 contre un groupe de 450 qui avait reçu le placebo. Malheureusement, cet essai clinique a également échoué. Il n'a montré aucune différence de survie sans récurrence chez la population étudiée avec une médiane de 11 mois dans le groupe MAGE-A3 et de 11,2 mois dans le groupe placebo [31].

L'échec de ces deux études suggère qu'une approche d'immunothérapie antigène-spécifique seule n'était pas suffisante.

Concernant la thérapie de transfert adoptif, malgré la spécificité de MAGE-A3, les quelques essais réalisés ont montré une toxicité sévère. Dans un premier essai clinique, neuf patients ont été traités avec des lymphocytes du sang périphérique autologues modifiés pour exprimer des récepteurs de MAGE-A3 et réinjectés chez le patient. Deux patients sont décédés des suites de dommages neuronaux et un autre a développé des symptômes s'apparentant à la maladie de Parkinson, qui se sont ultérieurement résorbés en quatre semaines. Le récepteur utilisé était capable de reconnaître non seulement l'épitope de MAGE-A3, mais également ceux de MAGE-A9 et MAGE-A12. Ce dernier étant exprimé dans le cerveau, l'injection des cellules T modifiées a provoqué une réponse inflammatoire importante entraînant la destruction de cellules neuronales [32]. Dans une autre étude, des lymphocytes T ont été modifiés pour reconnaître le récepteur MAGE-A3 avec une affinité augmentée chez des patients atteints de myélome et de mélanome. Les deux premiers patients traités sont décédés en quelques jours à la suite d'un arrêt cardiaque provoqué par la reconnaissance d'un épitope d'une protéine cardiaque nommée Titin qui n'avait pas été identifiée comme réactive lors des études précliniques [33, 34]. Ces exemples illustrent la nécessité de développer les études *in vitro* préliminaires, afin d'éliminer toute possibilité d'interactions non ciblées (*off-target*).

- **NY-ESO-1**

NY-ESO-1 (*New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma 1*) est aussi localisé sur le chromosome X. Il appartient à une famille qui comporte deux autres CTA homologues localisés dans la même région : LAGE-1 et ESO3. Même si la fonction cellulaire de NY-ESO-1 est encore peu connue, la présence d'un domaine Pcc-1 en C-terminal indique qu'il pourrait être impliqué dans la régulation du cycle cellulaire ou la croissance. Dans les cellules germinales, son expression est restreinte aux spermatogonies et spermatozoïdes primaires et, dans les tumeurs, l'expression de NY-ESO-1 est importante (> 40 %) dans plusieurs types de cancers incluant les liposarcomes, les neuroblastomes, les sarcomes synoviaux, les mélanomes ou les cancers ovariens. Il n'en reste pas moins exprimé à des niveaux plus faibles dans d'autres tissus cancéreux comme la vessie, l'œsophage, le poumon, le foie, les voies aérodigestives, la prostate et le sein [9, 14]. L'expression de NY-ESO-1 est hétérogène dans la plupart des tissus, hormis le sarcome synovial et le liposarcome myxoïde à cellules rondes, pour lesquels les meilleurs résultats ont été obtenus grâce aux essais cliniques d'immunothérapie [35]. À ce jour, 139 essais cliniques, terminés ou en cours, impliquent NY-ESO-1 selon la liste disponible sur <https://clinicaltrials.gov/>.

Jusqu'à aujourd'hui, 21 épitopes différents ont été identifiés sur NY-ESO-1, donnant ainsi lieu à de multiples essais de vaccins. En 2004, des patients atteints de mélanome ont été traités avec une protéine recombinante (forme totale) de NY-ESO-1 seule, ou en combinaison avec un adjuvant nommé ISCOMATRIX à base de saponine. Cet essai, qui avait principalement pour but d'évaluer la toxicité et l'immunogénicité de la construction, a permis d'induire une grande quantité d'anticorps spécifiques à NY-ESO-1, des cellules T CD8+ et CD4+, et également de mettre en évidence de nouveaux épitopes, dont certains partagés avec LAGE-1 [36]. Une autre méthode qui a fait ses preuves dans le cas de NY-ESO-1 est l'utilisation de cellules dendritiques modifiées grâce à leur capacité à activer fortement les cellules T. Plusieurs essais sont en cours ou terminés utilisant des cellules dendritiques modifiées avec NY-ESO-1, avec ou sans adjuvants, et ce sur différents types de cancer : prostate [37], sarcome (NCT01883518)¹, mélanome (NCT02334735) ou encore tumeurs solides (NCT02224599). Enfin, un essai clinique de phase I, débuté en 2014, étudie la tolérance et la réponse immunitaire de vecteurs lentiviraux ciblant les cellules dendritiques spécifiques à NY-ESO-1 dans les mélanomes, les cancers du poumon non à petites cellules, les cancers ovariens et les sarcomes (NCT02122861).

Les essais préliminaires ont pu montrer l'efficacité des thérapies de transfert adoptif de lymphocytes T grâce à NY-ESO-1. Des cellules T de patients atteints de mélanome et de sarcome synovial exprimant NY-ESO-1 ont été modifiées pour exprimer le récepteur spécifique de

NY-ESO-1. Après injection de ces cellules chez les patients, ce protocole a permis d'observer une réponse clinique dans 55 % et 61 % des cas, respectivement, sans induire de cytotoxicité [38]. Le même traitement a été administré à 20 patients atteints de myélome multiple et a conduit à une réponse complète ou partielle chez 80 % des patients, avec une survie sans récurrence de 19,1 mois. Il a ainsi été montré que le nombre de cellules T modifiées était inversement proportionnel à l'expression de NY-ESO-1 au niveau de la moelle, et qu'une progression de la pathologie était associée à une perte de la persistance des cellules T [39]. Par ailleurs, deux essais cliniques de phase I/II sont en cours pour évaluer la sécurité et l'activité de la transduction de lymphocytes T avec des récepteurs de cellules T (*T-cell receptors* [TCR]) présentant une affinité augmentée pour NY-ESO-1 et LAGE-1. Ces essais concernent des patients atteints de myélome multiple à un stade avancé ou qui présentent des récurrences (NCT01892293, NCT01352286).

Si MAGE-A3 et NY-ESO-1 sont les CTA pour lesquels il y a eu le plus d'essais d'immunothérapie développés, d'autres CTA font également l'objet d'études plus récentes.

- **Autres CTA**

Parmi les 276 CTA identifiés et répertoriés dans la base de données CTDatabase, il y a également d'autres cibles envisagées pour l'immunothérapie comme les protéines de la famille SSX ou PRAME, le but étant principalement de trouver la cible qui engendrera le moins de toxicité possible pour le patient. SSX (CT5) – pour *Synovial Sarcoma, X Breakpoint 1* – est une famille qui comporte cinq membres homologues tous localisés sur le chromosome X, et PRAME (CT130) – pour *PReferentially expressed Antigen in Melanoma* – est, quant à lui, localisé sur le chromosome 22. En 2013, un essai clinique de phase II randomisé utilisant PRAME a débuté afin d'étudier l'action d'une protéine PRAME recombinée avec un adjuvant AS15 chez 137 patients avec un cancer du poumon non à petites cellules en comparaison à un placebo. Malheureusement, cette étude a dû être stoppée en 2016 à la suite d'un défaut de protocole (NCT01853878). En revanche, un nouvel essai de phase I/II, avec pour objectif d'évaluer l'activité de cellules T modifiées génétiquement pour exprimer un récepteur PRAME, pour traiter des patients atteints de leucémie myéloïde (NCT02743611), est toujours en cours. Par ailleurs, le transfert adoptif est l'approche utilisée pour un autre essai clinique I/II en phase de recrutement afin d'évaluer la tolérance et l'efficacité de cellules T dérivées des patients atteints de néoplasmes myéloïdes et lymphoïdes, transduites avec un récepteur de PRAME (NCT03503968). En plus de ces essais, il est à noter que la grande majorité des essais cliniques en cours impliquant PRAME se concentrent sur une approche multi-TAA (*tumor associated antigens*). En effet, des études concentrées sur de multiples CTA ont été menées, notamment en ciblant un grand nombre de membres de la famille MAGE (MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10 et MAGE-C2) ou encore des CTA dont la fonction est impliquée dans

¹ Essais cliniques en cours n'ayant pas fait l'objet d'une publication. NCT number correspond à l'identifiant ClinicalTrials.gov.

la prolifération et la survie des cellules cancéreuses (MAGE-A4, SSX et PRAME). Par exemple, une vague d'essais cliniques de phase I-II nommés TACTIC (NCT03093350), TACTOPS (NCT03192462), TACTASOM (NCT02239861) et TACTAM (NCT02291848) a débuté en 2015, ayant tous une même approche multi-CTA (NY-ESO-1 + MAGE-A4 + PRAME + Survivine + SSX2) sur différents cancers, respectivement : les cancers du sein, du pancréas, les rhabdomyosarcomes et les myélomes multiples. Le but de ces essais était d'évaluer la toxicité et d'estimer les éventuels effets secondaires liés aux lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de ce cocktail de CTA. On pourrait également citer l'essai ADSPAM (NCT02494167), débuté en 2015, qui utilise une autre combinaison impliquant des CTA : NY-ESO-1, PRAME, WT1, et Survivine, exprimés dans les syndromes myéloplasiques et les leucémies myéloïdes aiguës. Cet essai, non randomisé, vise à évaluer la dose de cellules T autologues à ré-administrer chez 44 patients atteints des cancers précédemment cités. Les résultats sont attendus début 2025. Ainsi, comme l'illustrent ces derniers essais, il faudra attendre encore quelques années afin de valider cette stratégie multi-CTA et d'envisager la famille des CTA comme le remède espéré pour le traitement des cancers.

Discussion et conclusion

Les CTA présentent un intérêt certain pour l'immunothérapie grâce à leurs caractéristiques uniques :

- la surexpression de nombreux CTA dans différents types de cancers alors qu'ils sont absents dans les tissus somatiques, mais présents dans les testicules ;
- une forte immunogénicité de certains CTA ;
- une expression ou co-expression de plusieurs CTA corrélée avec l'agressivité tumorale et le mauvais pronostic.

Ainsi, les premiers CTA identifiés, tels que MAGE-A3 et NY-ESO-1, ont été inclus dans des essais cliniques d'envergure. L'existence de plus de 276 CTA, répertoriés dans la base de données (<http://www.cta.lncc.br/>), permet donc de considérer chacun d'entre eux comme une nouvelle cible thérapeutique.

En revanche, même si les CTA paraissent être des cibles idéales pour l'immunothérapie, certains obstacles restent encore à franchir au vu des échecs observés avec les essais cliniques ciblant MAGE-A3. Un de ces obstacles majeurs est leur expression hétérogène au sein des tumeurs. En effet, NY-ESO-1 a une expression variable pour les mêmes types de tumeurs et PRAME est exprimé différemment dans des clones cellulaires dérivés d'une seule lésion de mélanome [35, 40]. Pour contrer ce fait, l'immunothérapie ciblant des CTA peut être utilisée en combinaison avec des méthodes dites classiques, telles que la chimiothérapie et la radiothérapie. En effet, les cellules résistantes à ces traitements génèrent de nouvelles souches de cellules résistantes et entraînent de fréquentes récurrences des cancers traités. Or, la surexpression des CTA est associée à la malignité des cancers. Ainsi, on peut imaginer que les

cellules résistantes, qui surexpriment ces CTA, peuvent être ciblées avec des immunothérapies. À titre d'exemple, la combinaison d'un vaccin contre NY-ESO-1 avec la doxorubicine et la décitabine a permis d'augmenter la réponse humorale et immunitaire CD8+ chez 50 % des patients traités pour un cancer ovarien. Une rémission sans récurrence a pu aussi être observée chez 50 % des patients avec une durée de 6,3 mois [41]. Ainsi, sachant que les CTA sont souvent co-exprimés dans des cancers, cibler simultanément de multiples CTA, à l'instar de certains essais cliniques en cours, TACTIC et TACTOPS, peut être une stratégie gagnante, surtout en combinaison avec la chimiothérapie et la radiothérapie. Pour conclure, les premiers résultats obtenus avec les combinaisons de traitements évoquées dans cette revue indiquent que les CTA sont des cibles évidentes pour l'immunothérapie, et que de futures approches innovantes peuvent tirer profit de ces protéines à expression bien particulière.

Take home messages

- Les *cancer/testis antigen* (CTA) regroupent plus de 70 familles, 276 membres au total, répertoriés dans une base de données (<http://www.cta.lncc.br/>) et caractérisés par une immunogénicité importante et un profil d'expression unique : seulement dans les testicules en physiologie et ré-exprimés dans différents types de cancer.
- La plupart des fonctions de CTA décrites à ce jour participent aux caractéristiques essentielles au développement des cellules cancéreuses : une croissance incontrôlée, la résistance à l'apoptose, ou encore une capacité à migrer.
- Le niveau d'expression des CTA ainsi que le nombre de CTA exprimés sont corrélés à l'agressivité des cancers et la gravité du pronostic chez les patients.
- Grâce à une immunogénicité importante, les essais cliniques d'immunothérapie de phase II et III impliquant MAGE-A3 ou NY-ESO-1 se sont développés ces dernières années et se sont parfois heurtés à des problèmes de spécificité (DERMA, MAGRIT).
- Des essais cliniques en cours impliquent de nouvelles stratégies : utiliser une approche multi-CTA en ciblant plusieurs protéines ou encore combiner les traitements actuels (chimiothérapie, radiothérapie) à l'immunothérapie CTA pour en augmenter l'efficacité.

RÉFÉRENCES

1. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991 ; 254 : 1643-7.
2. Chen Y-T, Scanlan MJ, Sahin U, et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 ; 94 : 1914-8.

3. Barrow C, Browning J, MacGregor D, et al. Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res* 2006 ; 12 : 764-71.
4. Andrade VCC, Vettore AL, Felix RS, et al. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immunol* 2008 ; 8 : 2.
5. Almeida LG, Sakabe NJ, deOliveira AR, et al. CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. *Nucleic Acids Res* 2009 ; 37 : D816-9.
6. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen Y-T. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 2002 ; 188 : 22-32.
7. Cheng Y-H, Wong EW, Cheng CY. Cancer/testis (CT) antigens, carcinogenesis and spermatogenesis. *Spermatogenesis* 2011 ; 1 : 209-20.
8. Hofmann O, Caballero OL, Stevenson BJ, et al. Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 ; 105 : 20422-7.
9. Thomas R, Al-Khadairi G, Roelands J, et al. NY-ESO-1 based immunotherapy of cancer: current perspectives. *Front Immunol* 2018 ; 9 : 947.
10. Sigalotti L, Coral S, Nardi G, et al. Promoter methylation controls the expression of MAGE2, 3 and 4 genes in human cutaneous melanoma. *J Immunother* 2002 ; 25 : 16-26.
11. Schrupp DS, Nguyen DM. Targeting the epigenome for the treatment and prevention of lung cancer. *Semin Oncol* 2005 ; 32 : 488-502.
12. Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth A, Chen Y-T, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2005 ; 5 : 615-25.
13. Takahashi K, Shichijo S, Noguchi M, Hirohata M, Itoli K. Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res* 1995 ; 55 (16) : 3478-82.
14. Jungbluth AA, Chen Y-T, Stockert E, et al. Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues. *Int J Cancer* 2001 ; 92 : 856-60.
15. Satie A-P, Rajpert-De Meyts E, Spagnoli GC, et al. The cancer-testis gene, NY-ESO-1, is expressed in normal fetal and adult testes and in spermatocytic seminomas and testicular carcinoma in situ. *Lab Invest* 2002 ; 82 : 775-80.
16. Meuwissen RLJ, Meerts I, Hoovers JMN, Leschot NJ, Heyting C. Human synaptonemal complex protein 1 (SCP1): isolation and characterization of the cDNA and chromosomal localization of the gene. *Genomics* 1997 ; 39 : 377-84.
17. Bellani MA. SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of *Atm*^{-/-} spermatocytes. *J Cell Sci* 2005 ; 118 : 3233-45.
18. Han C, Kwon JT, Park I, et al. Impaired sperm aggregation in *Adam2* and *Adam3* null mice. *Fertil Steril* 2010 ; 93 : 2754-6.
19. Kim E, Yamashita M, Nakanishi T, et al. Mouse sperm lacking *ADAM1b/ADAM2* fertilin can fuse with the egg plasma membrane and effect fertilization. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 5634-9.
20. Wang J, Wang H, Hou W, et al. Subnuclear distribution of *SSX* regulates its function. *Mol Cell Biochem* 2013 ; 381 : 17-29.
21. Kim Y, Park D, Kim H, et al. miR-200b and cancer/testis antigen CAGE form a feedback loop to regulate the invasion and tumorigenic and angiogenic responses of a cancer cell line to microtubule-targeting drugs. *J Biol Chem* 2013 ; 288 : 36502-18.
22. Mei AH-C, Tung K, Han J, et al. MAGE-A inhibit apoptosis and promote proliferation in multiple myeloma through regulation of BIM and p21Cip1. *Oncotarget* 2020 ; 11 : 727-39.
23. Lv C, Fu S, Dong Q, et al. PAGE4 promotes prostate cancer cells survive under oxidative stress through modulating MAPK/JNK/ERK pathway. *J Exp Clin Cancer Res* 2019 ; 38 : 24.
24. Tang F, Tang S, Guo X, Yang C, Jia K. CT45A1 siRNA silencing suppresses the proliferation, metastasis and invasion of lung cancer cells by downregulating the ERK/CREB signaling pathway. *Mol Med Rep* 2017 ; 16 : 6708-14.
25. Shi D-B, Ma R-R, Zhang H, Hou F, Guo X-Y, Gao P. GAGE7B promotes tumor metastasis and growth via activating the p38 δ /pMAPKAPK2/pHSP27 pathway in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2019 ; 38 : 124.
26. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of cancer. *Cell* 2000 ; 100 : 57-70.
27. Lu Y-C, Robbins PF. Cancer immunotherapy targeting neoantigens. *Semin Immunol* 2016 ; 28 : 22-7.
28. Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov* 2019 ; 18 : 175-96.
29. Esfandiary A, Ghafouri-Fard S. MAGE-A3: an immunogenic target used in clinical practice. *Immunotherapy* 2015 ; 7 : 683-704.
30. Vansteenkiste JF, Cho BC, Vanakesa T, et al. Efficacy of the MAGE-A3 cancer immunotherapeutic as adjuvant therapy in patients with resected MAGE-A3-positive non-small-cell lung cancer (MAGRIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016 ; 17 : 822-35.
31. Dreno B, Thompson JF, Smithers BM, et al. MAGE-A3 immunotherapeutic as adjuvant therapy for patients with resected, MAGE-A3-positive, stage III melanoma (DERMA): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2018 ; 19 : 916-29.
32. Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga DD, et al. Cancer regression and neurologic toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother (1997)* 2013 ; 36 : 133-51.
33. Cameron BJ, Gerry AB, Dukes J, et al. Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells. *Sci Transl Med* 2013 ; 5 : 197ra103.
34. Linette GP, Stadtmayer EA, Maus MV, et al. Cardiovascular toxicity and Titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* 2013 ; 122 : 863-71.
35. Woloszynska-Read A, Mhawech-Fauceglia P, Yu J, Odunsi K, Karpf AR. Intertumor and intratumor NY-ESO-1 expression heterogeneity is associated with promoter-specific and global DNA methylation status in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2008 ; 14 : 3283-90.
36. Davis ID, Chen W, Jackson H, et al. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4+ and CD8+ T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 ; 101 : 10697-702.
37. Westdorp H, Creemers JHA, van Oort IM, et al. Blood-derived dendritic cell vaccinations induce immune responses that correlate with clinical outcome in patients with chemo-naïve castration-resistant prostate cancer. *J Immunother Cancer* 2019 ; 7 : 302.
38. Robbins PF, Kassim SH, Tran TLN, et al. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T cell receptor: long term follow up and correlates with response. *Clin Cancer Res* 2015 ; 21 : 1019-27.
39. Rapoport AP, Stadtmayer EA, Binder-Scholl GK, et al. NY-ESO-1 specific TCR engineered T-cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med* 2015 ; 21 : 914-21.
40. Sigalotti L, Fratta E, Coral S, et al. Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* 2004 ; 64 : 9167-71.
41. Odunsi K, Matsuzaki J, James SR, et al. Epigenetic potentiation of NY-ESO-1 vaccine therapy in human ovarian cancer. *Cancer Immunol Res* 2014 ; 2 : 37-49.

6.1.2. Relation entre les CTA et la mitochondrie

La perspective d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le cancer nous a amené revisiter les caractéristiques des CTA, famille composée de 276 membres, dont plus de la moitié ont une fonction cellulaire inconnue. Leur principale caractéristique est une expression restreinte à la spermatogenèse et la tumorigenèse. Ces deux processus partagent des mécanismes communs à savoir une prolifération cellulaire intense, une invasion et une migration, et également une adaptation métabolique particulière, impliquant des modifications mitochondriales métaboliques importantes. Dans la revue suivante, nous avons soulevé la question de savoir s'il existait des CTA mitochondriaux, et quels seraient leurs fonctions ?

Dans ce sens, nous avons appliqué deux stratégies pour les identifier les CTAs codant des protéines mitochondriales. D'une part, en utilisant les bases de données précisant les protéines avec des fonctions mitochondriales, nous avons identifié 10 CTA, pour lesquels la bibliographie disponible sur PUBMED a mis en évidence pour cinq d'entre eux des publications les associant à la mitochondrie : GPAT2, COX6B2, FATE1, KIAA0100 et SPATA19. Dans un second temps, nous avons réalisé *in silico*, grâce à quatre logiciels de prédiction, un criblage pour identifier la présence d'une séquence MTS (Mitochondrial Targeting Sequence) dans l'ensemble des transcrits - 655 au total - codés par les 276 CTA. Nous avons ainsi identifié 143 transcrits issus de 67 CTA pour lesquels un adressage à la mitochondrie est prédit par l'un des 4 programmes. Pour certains d'entre eux, leur fonction est totalement inconnue. D'autres, en revanche, ont été décrits dans des mécanismes physiologiques ou pathologiques, compatibles avec une localisation potentielle à la mitochondrie, comme la signalisation du calcium ou la biosynthèse des piRNA. Les nombreuses implications des CTAs à la mitochondrie suggère de plus que la composition des mitochondries peut être variable en fonction des tissus et de leur physiologie, une particularité déjà relevée dans des cas particuliers (Calvo and Mootha, 2010), mais en général peu assimilée. De fait les CTA mitochondriaux représentent de nouvelles cibles pour l'élaboration de nouveaux traitements anti-cancéreux.

Revue : Aurrière, J., Goudenège, D., Baris, O.R., Boguenet, M., May-Panloup, P., Lenaers, G., Khiati, S. Cancer/Testis Antigens into mitochondria : a hub between spermatogenesis, tumorigenesis and mitochondrial physiology adaptation, Mitochondrion (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.11.002>



Review

Cancer/Testis Antigens into mitochondria: a hub between spermatogenesis, tumorigenesis and mitochondrial physiology adaptation

Jade Aurrière^a, David Goudenège^{a,b}, Olivier R. Baris^a, Magalie Boguenet^a,
Pascale May-Panloup^{a,c}, Guy Lenaers^a, Salim Khiati^{a,*}

^a MitoLab Team, Institut MitoVasc, CNRS UMR6015, INSERM U1083, Angers University, Angers, France

^b Departments of Biochemistry and Genetics, University Hospital Angers, Angers, France

^c Reproductive Biology Unit, Angers University Hospital, 49000 Angers, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Mitochondrion
Cancer/Testis Antigen
Localization
Spermatogenesis
Tumorigenesis

ABSTRACT

Cancer/Testis Antigens (CTAs) genes are expressed only during spermatogenesis and tumorigenesis. Both processes share common specific metabolic adaptation related to energy supply, with a glucose to lactate gradient, leading to changes in mitochondrial physiology paralleling CTAs expression. In this review, we address the role of CTAs in mitochondria (mitoCTAs), by reviewing all published data, and assessing the putative localization of CTAs by screening for the presence of a mitochondrial targeting sequence (MTS). We evidenced that among the 276 CTAs, five were already shown to interfere with mitochondrial activities and 67 display a potential MTS.

1. Introduction – Discovering CTAs

Cancer/Testis Antigens (CTAs) represent a group of proteins whose expression under physiological conditions is restricted to testis, but also activated in many human cancers. The first CTA, MZ2-E, named MAGE-A1, was identified in 1991 as a melanoma tumor antigen, recognized by cytotoxic T lymphocytes *in vitro* (van der Bruggen et al., 1991). Later, the screening of a recombinant cDNA expression library, built from sera of Melanoma patients, unraveled a new family of antigens sharing two features (Chen et al., 1997): i) mRNA expression restricted to testis, and eventually to very few other tissues, and ii) mRNA expression activated during tumor development.

With the discovery of a larger number of CTAs, their molecular characteristics became more detailed: i) many CTAs are localized on the X chromosome, where they are organized in multigenic “operon-like” clusters, ii) their expression can be correlated with tumor growth and stage, and iii) they can be activated by hypomethylation and inhibition of histone deacetylation *in vitro* (Scanlan et al., 2002). As of today, 276

CTAs have been identified and compiled in a unique CTA-Database (<http://www.cta.lncc.br/>) (Almeida et al., 2009).

With their expansion, new classification criteria emerged. First, CTAs were divided into two groups based on their chromosomal localization: X-CTAs, localized on the X-chromosome, and non-X CTAs, localized on autosomal chromosomes. More than half of the CTAs belong to the first group and are organized in multigene families, while non-X CTAs genes are dispersed along the 22 autosomes. Second, although CTAs are testis-restricted expression, some of them are expressed under physiological conditions in few other tissues, mainly in the brain or in ovary. This led to a further classification in three groups: testis-restricted, testis/brain-restricted and testis-selective, depending on their expression pattern (Hofmann et al., 2008).

2. CTAs expression during cancer

CTAs expression can be specific to a single tumorigenesis step or common to all steps of cancer development, leading to three expression

Abbreviations: ATP, Adenosine TriPhosphate; BTB, Blood-Testis Barrier; cDNA, complementary DeoxyriboNucleic Acid; CTA, Cancer/Testis Antigen; DNA, DeoxyriboNucleic Acid; ER, Endoplasmic Reticulum; GO, Gene Ontology; HNSCC, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; IMPI, Integrated Mitochondrial Protein Index; KO, KnockOut; lncRNA, long non-coding RiboNucleic Acid; MAM, Mitochondria-Associated ER Membrane; mitoCTA, Cancer/Testis Antigen with mitochondrial function; mRNA, messenger RiboNucleic Acid; mtDNA, Mitochondrial DeoxyriboNucleic Acid; MTS, Mitochondrial Targeting Sequence; non X-CTA, CTA localized on Y-chromosome and autosomal chromosomes; OXPHOS, OXidative PHOSphorylation; piRNA, piwi-interacting RiboNucleic Acid; RNA, RiboNucleic Acid; X-CTA, CTA localized on X-chromosome; aa, amino acid; miR, microRNA.

* Corresponding author at: MitoLab team, CHU Bât IRIS/IBS, Rue des Capucins, 49933 Angers cedex 9, France

E-mail address: salim.khiati@univ-angers.fr (S. Khiati).

<https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.11.002>

Received 12 May 2020; Received in revised form 18 October 2020; Accepted 2 November 2020

Available online 19 November 2020

1567-7249/© 2020 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

profiles. First, most CTAs are broadly expressed during metastasis, while less frequently in primary tumors. For example, MAGE-A1 expression is observed in 51% of distant metastasis, but only in 20% of melanoma primary tumors. Similarly, MAGE-A4 is expressed in 44% of metastatic malignant melanoma, but only in 9% of primary tumors (Barrow, 2006). These features suggest that CTAs are biomarkers of poor prognosis in patients with cancer. Second, co-expression of different CTAs in one cancer type is often observed, notably for X-CTAs. For example, in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC), the simultaneous expression of five CTAs (SPANX-C, D, MAGEB2, MAGEA1, MAGEB6 and CXORF48) was reported in 27% to 71.9% of analyzed HNSCC samples, depending of the malignant phenotype and the prognosis (Zamunér et al., 2015). Finally, it was observed that co-expression of multiple CTAs at later stages of cancer worsens the prognosis. In this respect, multiple myeloma patients expressing more than 6 CTAs have a much poor prognosis than those expressing less than 6 CTAs (Andrade et al., 2008). This can be related to processes allowing cancer cells to recombine their genome, evade apoptosis and favor tissue invasion (Hanahan and Weinberg, 2000). Indeed, co-expression of FMR1NB, NXF2, and SXX2, induces genomic instability, while expression of SSX and CAGE sustains tumor growth. In addition, the expression of MAGE-A, MAGE-B, MAGE-C, GAGE, PAGE4 and CAGE inhibits apoptosis, while the expression of MAGE-C2, GAGE, XAGE1, CAGE and CT45A1 induces cancer invasion and metastasis (Gjerstorff et al., 2015). Owing to their unique expression profiles, CTAs are privileged targets for the development of immunotherapy cancer treatments. This led to the development of MAGE family members and NY-ESO1 antibody-targeted clinical trials (Cheng et al., 2011; Thomas et al., 2018; Vansteenkiste et al., 2016). Nevertheless, a better understanding of CTAs' functions in tumorigenesis is required in order to identify other relevant targets for new anti-cancer therapies.

3. CTAs expression during spermatogenesis

Spermatogenesis occurs in testis in seminiferous tubules, to produce mature functional spermatozoa (Neto et al., 2016). The seminiferous tubule is composed of somatic cells and Sertoli cells supporting the development of the germline cells: spermatogonia, spermatocytes, spermatids and spermatozoa (Fig. 1). Spermatogonia germ cells, which are located at the periphery of the seminiferous tubules, are in contact with blood. They proliferate and differentiate into primary

spermatocytes by mitotic division. Primary spermatocytes undergo meiosis leading respectively to secondary spermatocytes and round spermatids, which are haploid cells. Round spermatids progressively engage in a differentiation phase leading to the development of mature spermatozoa. These processes are supported by the Sertoli cells, which are essential for germ cell line development, notably by producing and providing energy. The volume of these cells is consistently important so that they can support simultaneously about 30 germ cells at various developmental stages (Russell et al., 1990) (Fig. 1).

Although the functions of CTAs during spermatogenesis are poorly understood, their expression patterns have been well documented. Some CTAs are germ cell specific, whereas others are expressed during meiosis or at post-meiotic stages. Similar to the tumorigenesis process, some CTAs are expressed only during a single specific spermatogenesis step, while others are expressed during many steps. Only a few CTAs are expressed during all spermatogenesis steps, such as the Magphinin family (Cheng et al., 2011). Notably, X-CTAs are highly expressed during the first stages of spermatogenesis, before meiosis. In addition, NY-ESO-1, MAGEA1 and SSX family members are strongly expressed in spermatogonia, in mitotically proliferating germ cells and in primary spermatocytes (Satie et al., 2002; Stoop et al., 2001; Takahashi et al., 1995). Conversely, non-X CTAs, such as ACRBP (also known as OY-TES-1) and SPA17, are mostly expressed in post-meiotic phases, from the round spermatids step to the maturation of spermatozoa (Cheng et al., 2011).

Importantly, expression of many CTAs is essential for spermatogenesis, as knocking out their genes in mice (Knockout, KO) results in infertility and altered sperm cells (Babatunde et al., 2017). For example, PIWIL2 and TDRD1 KO male mice are infertile, with early meiotic prophase arrest during spermatogenesis (Kuramochi-Miyagawa, 2004; Reuter et al., 2009), while ADAM2 and ROPN1 KO male mice exhibit compromised morphology or migration of sperm cells (Fiedler et al., 2013; Han et al., 2010). Moreover, although fertile, THEG and CTCFL KO mice display smaller testes and increased sperm cell death, respectively (Mannan et al., 2003; Suzuki et al., 2010).

At a mechanistic level, only the functions of a few CTAs have been described during spermatogenesis. Some are involved in cell cycle progression, such as NY-ESO-1, which acts together with members of the MAGE family (Thomas et al., 2018). MAGEA1 has been further identified as a transcriptional repressor, recruiting histone deacetylase during the early stages of spermatogenesis (Laduron et al., 2004). Similar

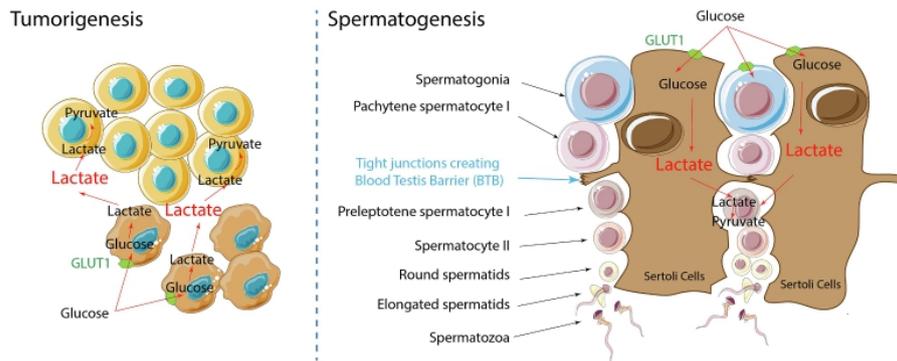


Fig. 1. Schematic illustration of a metabolic synergy between two cell populations during tumorigenesis and spermatogenesis. During tumorigenesis and spermatogenesis, lactate production, shuttling and gradient are defining energetic limiting parameters, enforcing a symbiotic cooperation between different cell populations. Left panel: during tumorigenesis, under hypoxia condition in tumors, cancer cells located at the center use glycolysis as the main source of energy and release lactate in the microenvironment to support energy production by normoxic tumor cells, thus contributing to their proliferation and tumorigenesis. Right panel: during spermatogenesis, Sertoli cells, which use glycolysis, support spermatogenesis by supplying lactate to cells located after the blood–testis barrier. Lactate is taken up by spermatocytes I and spermatocytes II and used as the source for ATP production by mitochondria. The cells shown in this figure were created using images modified from Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License. (<http://smart.servier.com>).

activity was associated with SXX in both gametogenesis (Babatunde et al., 2017) and tumorigenesis, and it is regulated by a differential cellular localization (Wang et al., 2013). In contrast, the non-X CTAs that are expressed in the late stages of spermatocyte differentiation play a role in meiosis. For example, SCP1 generates the transversal filaments of the synaptonemal complex (Meuwissen et al., 1997), while SPO11 induces double-strand DNA breaks to initiate the recombination events during meiosis (Vrielynck et al., 2016). Finally, ADAM2 is expressed on the spermatozoa surface to allow sperm-egg membrane binding (Kim et al., 2006).

4. Shared features between spermatogenesis and cancer: energy metabolism sustains cell proliferation

The very unique expression pattern of CTAs suggests their involvement in common mechanisms between spermatogenesis and tumorigenesis. Beyond the processes involved in cell proliferation, immortalization, invasion, and migration (see reviews by (Simpson et al., 2005; Whitehurst, 2014)), we wish to raise here the fact that spermatogenesis and tumorigenesis similarly involve a major metabolic shift, likely involving major mitochondrial regulations. Indeed, during carcinogenesis, cancer cells undergo a metabolic switch from aerobic respiration towards aerobic glycolysis, the so-called *Warburg effect*. This leads to a massive production of pyruvate from the available glucose. Some glycolysis intermediates are then used for the anabolism dedicated to cell proliferation. Moreover, pyruvate is converted to lactate, which is excreted in the tumor environment and used by surrounding cells to produce large amounts of pyruvate, and subsequently ATP through the oxidative phosphorylation (OXPHOS) process in mitochondria (Feron, 2009). In most cancer cells, this process is further related to cell death resistance, insensitivity to growth suppressors, invasion, migration and angiogenesis (Hanahan and Weinberg, 2011). Importantly, in tumors (Fig. 1-left panel), both proliferating glycolytic cells and their surrounding oxidative partners are working synergistically to efficiently promote tumor development.

Interestingly, during spermatogenesis, a similar situation is encountered in the seminiferous tubules, with lactate gradient extending from the Sertoli cells to the center of the tubules. In the periphery, Sertoli cells, which contribute to the Blood-Testis Barrier (BTB), have access to blood glucose to generate large amounts of lactate via the glycolysis. Similarly, the spermatogonia and primary spermatocytes located at the basal compartment generate lactate by glycolysis (Ramalho-Santos et al., 2009), needed for the next steps of spermatogenesis. Indeed, deeper in the tubule, spermatocytes, spermatids, and spermatozoa, which compose the adluminal compartment, use lactate as an energy substrate to produce ATP by OXPHOS (Fig. 1-right panel), forcing mitochondria to engage in this process. Thus, the tubule fluid is enriched in lactate and poor in glucose, promoting a high oxidative activity in spermatozoa, despite having reduced access to oxygen (Boussouar and Benahmed, 2004; Rato et al., 2012). In conclusion, both spermatogenesis and tumorigenesis orchestrate a metabolic synergy between two cell populations: one producing lactate from glucose, another one using the available lactate to produce ATP by OXPHOS.

5. Prediction of CTAs acting on mitochondria

To identify and predict if some CTAs interfere with mitochondrial physiology, we used two *in silico* approaches. The first one identified all the CTAs that are already described in bibliographic databases as impacting on mitochondrial functions. The second, predicted all CTAs protein sequences that included a mitochondria targeting sequence (MTS), underlying their potential mitochondrial localization.

5.1. First approach: identification of CTAs acting on mitochondria

To identify CTAs that can potentially act on mitochondria, we

designed a four steps selective process based on online databases (Fig. 2). In Step 1, using the CTA-Database (<http://www.cta.lncc.br/>) (Almeida et al., 2009) we listed the 276 genes that are encoding CTAs. In Step 2, we analyzed the sequence of all *refseq* genes and transcripts to eliminate pseudogenes and lncRNA (Supplementary Table 1, highlighted in gray), reducing the list to 243 CTAs genes. In Step 3, using the integrated web resource Mitominer (Smith and Robinson, 2016), which lists all proteins with mitochondrial functions (Supplementary Table 2), we reduced the CTAs list to the proteins that were reported to act on mitochondria, by at least one of the four following databases:

- Gene Ontology (GO; <http://geneontology.org>), listing proteins associated with mitochondrial processes (Ashburner et al., 2000; “The Gene Ontology Resource, 2019”),
- MitoCarta, (<https://www.broadinstitute.org/files/shared/metabolism/mitocarta/human.mitocarta2.0.html>), a database including 1157 genes encoding mammalian mitochondrial proteins (Calvo et al., 2016),
- Integrated Mitochondrial Protein Index (IMPI, <http://www.mrc-mbu.cam.ac.uk/impi>) providing a collection of 1626 human genes encoding proteins with known (1184) or predicted (442) mitochondrial localization (Smith and Robinson, 2016),
- Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org>), listing proteins located in mitochondria using immunofluorescence imaging (Uhlen et al., 2015).

This led to the identification of 10 CTAs: FTHL17, KIAA0100, POTEH, DDX43, MAGEA11, GPAT2, FATE1, COX6B2, SPATA19 and PAGE1 (Table 1, Fig. 2). With the last Step 4, by Pubmed abstract mining, we further reduced this list to five CTAs that were confirmed as acting on mitochondria.

5.2. Second approach: identification of CTAs isoforms with a predicted mitochondrial targeting sequence

Among the estimated 2000 different proteins that compose the mitochondrial proteome, 13 are encoded and synthesized within the mitochondria, while the remaining are encoded by the nuclear genome, synthesized in the cytoplasm and then imported into mitochondria. The vast majority of these imported proteins contains the MTS, an N-terminal sequence with particular structure and hydrophobicity (Roise, 1997) which can be predicted *in silico*. We used four online prediction softwares: MitoFates (Fukasawa et al., 2015), MitoProt-II (Claros and Vincens, 1996), iPSORT (Bannai et al., 2002) and TargetP (Almagro Armenteros et al., 2019). Two of these tools, MitoFates and iPSORT, give clearcut results as “YES” if a MTS is predicted, and “NO” if it is absent. The two others, MitoProt-II and TargetP, provide a probability score, for which we selected the thresholds of 0.4 and 0.3 respectively.

To identify CTAs encoding for isoforms with a MTS, thus potentially located into mitochondria (mitoCTAs), we first listed all the mRNA transcripts encoded by the 243 CTAs analyzed in the previous screening (Fig. 3A). This led to the identification of 655 transcripts. Some CTAs encode a single mRNA variant, while others encode multiple mRNA variants, resulting from alternate splicing combinations. For example, the PTPN20 gene encodes as many as 55 different mRNAs variants and protein isoforms. We then ran the four prediction programs for each of the 655 corresponding protein sequences (Supplementary Table 3). We identified 143 isoforms encoded by 67 CTAs, which are predicted to harbor a MTS by at least one of the four programs (Supplementary Table 4). Fig. 3B represents a Venn diagram summarizing all results and their intersections. Notably, the MitoProt-II and iPSORT softwares led to larger numbers of isoforms with a predicted MTS, and an intersection including 58 different isoforms, encoded by 33 CTAs genes. Interestingly, some CTAs, such as CEP55, GAGE12G, RNF17, SPEF2 and TSAG10, encode different isoforms that are all predicted to harbor a MTS. However, other such as, TSPY1, CTNNA2, CTCFL and ODF2,

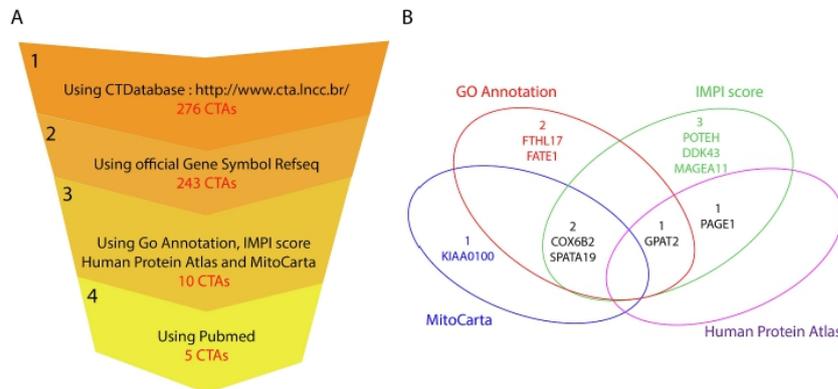


Fig. 2. Identification of CTAs acting on mitochondria (A) Description of the four steps workflow to identify the CTAs reported to act on mitochondria: Step 1) Using the CTDatabase, we listed 276 known CTAs. Step 2) Using official gene symbol and Refseq we excluded 5 pseudogenes, 8 ncRNA and 20 genes with wrong official CTA gene symbol, leading to a list of 243 CTAs. Step 3) Among the 243 CTAs, we identified 10 CTAs linked to mitochondrial functions in at least one of the following databases: MitoCarta, GO Annotation, IMPI score (threshold score greater than 0,5) and the Human Protein Atlas. Step 4) Using PubMed abstract mining, we identified 5 CTAs; COX6B2, GPAT2, SPATA19, FATE1 and KIAA0100 involved in mitochondrial functions.(B) Venn diagram distribution of the 10 CTAs identified in step 3, using the MitoCarta, GO Annotation, IMPI score and Human Protein Atlas databases.

Table 1
The 10 identified mitoCTAs in step 3 described in Fig. 2.

Gene	Complete Name	CT#	Cell function : mitochondria ?	Physiology/disease : Spermatogenesis	Cancer	Refs
<i>COX6B2</i>	Cytochrome C Oxidase Subunit 6B2	CT59	Subunit of Complex IV	Expressed in each step of spermatogenesis, sperm oxidative phosphorylation	Expressed in breast, lung cancer	(Carrero-Valenzuela et al., 1991; Chen et al., 2005; Hüttemann et al., 2003)
<i>FATE1</i>	Fetal And Adult Testis Expressed 1	CT43	Localized in MAMs, decreases ER/mitochondrial contacts and Ca ²⁺ uptake by mitochondria	ND	Inhibits pro-apoptotic pathways	(Doghman-Bouguerra et al., 2016; Maxfield et al., 2015)
<i>GPAT2</i>	Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 2	CT123	Localized in the OMM, synthesis of glycolipids	Essential in piRNA biogenesis, required for genome integrity during meiosis	Expressed in melanoma lung, prostate, breast cancers	(Garcia-Fabiani et al., 2017; Pellon-Maison et al., 2014; Shiromoto et al., 2013)
<i>SPATA19</i>	Spermatogenesis-Associated Protein 19	CT132	Mitochondrial cristae, shape organization, involved in Complex IV formation	Required for flagellum formation, mitochondrial adhesion in sperm	Expressed in prostate, basal cell carcinoma, breast cancers	(S. Ghafouri-Fard et al., 2010a; 2010b; 2010c; Soudeh Ghafouri-Fard et al., 2010a; 2010b; Mi et al., 2015; Wong et al., 2017)
<i>DDX43</i>	DEAD-Box Helicase 43	CT13	ND	ND	Expressed in melanoma, positive regulator of MAPK and PI3K/AKT pathways (cell proliferation pathways)	(Van Tongelen et al., 2017)
<i>FTHL17</i>	Ferritin Heavy Chain Like 17	CT38	ND	Implicated in regulation of iron homeostasis	Expressed in bladder, breast, lung, head and neck carcinomas	(Aoki et al., 2017; Loriot et al., 2003; Ruzzenenti et al., 2015)
<i>KIAA0100</i>	Breast Cancer-Overexpressed Gene 1 Protein	CT101	Predicted to be a mitochondrial protein by Bio-informatic analysis	ND	Expressed in breast cancer and myeloma and predicted to be an anti-apoptotic factor	(Cui et al., 2017; Liu et al., 2014; Song et al., 2006)
<i>MAGEA11</i>	MAGE Family Member A11	CT1.11	ND	ND	Expressed in neck and head, renal, breast cancer	(Hartmann et al., 2018a; 2018b; Su et al., 2019; Xia et al., 2013)
<i>PAGE1</i>	PAGE Family Member 1	CT16.3	ND	ND	Expressed in prostate cancer	(Brinkmann et al., 1998)
<i>POTEH</i>	POTE Ankyrin Domain Family Member H	CT104.7	ND	ND	Expressed in glioma	(Bera et al., 2004; Liu et al., 2011)

encode multiple isoforms among which only a few are potentially addressed to mitochondria. The last case illustrates the predominant role of mRNA alternate splicing in targeting proteins to different cell compartments.

6. CTAs functions into mitochondria

With the first approach based on bibliographical data mining, we identified 5 CTAs acting on mitochondria: SPATA19, GPAT2, FATE1, COX6B2 and KIAA0100.

SPATA19 (Spermatogenesis Associated 19) is a small mitochondrial protein of 154 amino acids (aa), with a 20 aa MTS. During spermatogenesis, SPATA19 is expressed in round spermatids and in the midpiece

of the sperm tail. Study of a germ cell-specific Spata19 KO mouse revealed that this protein is required for appropriate flagellum formation and sperm motility, while the sperm head and the nuclear DNA integrity is maintained. These defects are related to mitochondrial cristae disorganization and complex IV assembly reduction, leading to decreased ATP production (Mi et al., 2015). In prostate cancer (Wong et al., 2017) and basal cell carcinoma (S. Ghafouri-Fard et al., 2010a; 2010b), SPATA19 expression is correlated with poor prognosis.

GPAT2 is one of the four isoforms of the glycerol-3-phosphate acyltransferases (GPAT1-4) required for *de novo* synthesis of glycolipids (Garcia-Fabiani et al., 2017). These enzymes show different tissue expression patterns, subcellular localization, and substrate preferences. Among them, GPAT2 expression is restricted physiologically to testis,

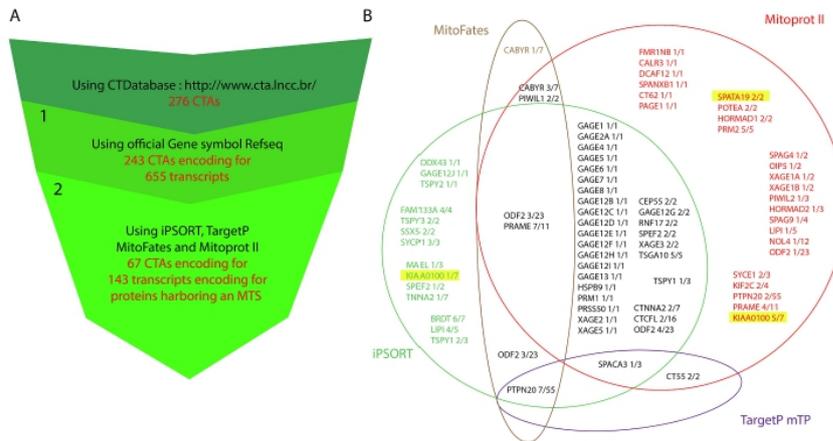


Fig. 3. Identification of mitoCTAs isoforms with a predicted MTS (A) Description of the three steps workflow to identify the CTAs with a predicted MTS. Step 1) Using the CTDatabase, we listed 276 CTAs. Step 2) we identified 655 isoforms encoded by the mRNAs of the 243 CTAs (see Fig. 1). Step 3) Using iPSORT, TargetP mTP, MitoFates and MitoProt-II online tools, we identified among them 143 isoforms encoded by 67 CTAs, for which a MTS predicted was predicted by at least one of the 4 tools. (B) Venn diagram representing the distribution of the 143 isoforms encoded by the 67 CTAs, with a MTS predicted by 1 or more of the 4 prediction tools: iPSORT (Green), MitoProt II (Red), MitoFates (Brown) and TargetP mTP (Purple). Each CTA gene symbol name is followed by the number of isoforms with a MTS, among the total number of isoforms encoded by the CTA. Example: SPACA3 1/3 means that SPACA3 encodes for 3 isoforms, with only one predicted with a MTS. Identified CTAs in the first approach are highlighted in yellow. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

and is overexpressed in various cancer including melanoma, prostate and breast cancers (Pellon-Maison et al., 2014). GPAT2 is located in the outer mitochondrial membrane, interacts with small non-coding RNAs and it is essential for the primary Piwi-interacting RNAs (piRNAs) biogenesis. This promote cell proliferation and resistance to staurosporin induced apoptosis (Shiromoto et al., 2013).

FATE1 (Fetal and Adult Testis Expressed 1) is a 183 aa protein that inhibits a pro-apoptotic pathway, by preventing BIK (BCL2-Interacting Killer) accumulation (Maxfield et al., 2015), thus promoting cell survival. FATE1 is localized at the contact sites between mitochondria and the endoplasmic reticulum (ER), the so-called mitochondrial associated membranes (MAM), due to the presence of a domain at its C-terminus required for its targeting to the mitochondrial compartment. FATE1 disrupts the ER/mitochondrial contacts, in order to prevent Ca²⁺ uptake by mitochondria, thus leading to an inhibition of Ca²⁺-dependent apoptosis (Doghman-Bouguerra et al., 2016). The expression of FATE1 is modulated by EWSR1-FL11, which is essential for Ewing sarcoma survival (Gallegos et al., 2019). In addition to its function in apoptosis, the presence of circulating antibodies directed against FATE1 in patients with adrenocortical carcinomas was reported. FATE1 mRNA expression levels in these patients are associated with high steroidogenic gene expression, immune cell depletion and worse prognosis (Doghman-Bouguerra et al., 2020). More recently, it was reported that FATE1 was differentially expressed between long-lived versus short-lived bats (Huang et al., 2020), suggesting a putative role in aging, which, however, needs to be further investigated.

COX6B2 (Cytochrome c Oxidase VIb-2), is a testis specific subunit of the cytochrome c oxidase (COX) which is the complex IV of the mitochondrial electron transport chain. COX6B2 is expressed in all steps of spermatogenesis to support the specific energy needs in testis (Hüttemann et al., 2003) and identified as an OXPHOS-related gene signature of lung adenocarcinoma (Xu et al., 2020). It was reported that COX6B2 facilitates the assembly of complex IV. The inhibition of COX6B2 in three pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines affects specifically complex IV activity without increasing glycolysis or subsequently altering cell growth (Nie et al., 2020). In this cancer model, COX6B2 maintains mitochondrial respiration to promote metastatic capacity rather than to increase growth capacity. Similarly, in lung adenocarcinoma cells, COX6B2 enhances OXPHOS activity and cell proliferation even in low O₂ environment. However, in this cell model, the loss of COX6B2 surprisingly induced cell apoptosis indicative of a strong dependency on OXPHOS activity (Cheng et al., 2020). Thus, it appears that

the biological role of COX6B2 might be cell-type specific, as its inhibition in other cell types induces cell death as well (Maxfield et al., 2015).

KIAA0100 also known as BCOX1 (Breast Cancer Over-eXpressed 1), was initially characterized in breast carcinomas (Song et al., 2006) with an expression negatively regulated by the microRNA miR-195. KIAA0100 is involved in cell proliferation, migration and invasion (Guo et al., 2015), but its specific function remains unknown. *In silico* sequence analyses of KIAA0100 isoforms revealed a signal peptide, a transmembrane domain and four domains related to FMP27 (Found in mitochondrial proteome protein 27) (Sickmann et al., 2003), suggesting its localization in mitochondria (Cui et al., 2017).

Thus, summing up the information collected on these 5 CTAs interacting with mitochondrial physiology, it appears that the regulation of i) the mitochondrial membrane structures and their interaction with MAMs, ii) the respiratory complex IV activity, iii) the biogenesis of non-coding RNAs and iv) the apoptosis, are key mitochondrial processes related to spermatogenesis and cancer.

In the second approach, aiming at the identification of CTAs exported to mitochondria, we found 67 CTAs genes, generating 143 mRNA variants encoding protein isoforms with a potential MTS. Among them, only two (SPATA19 and KIAA0100) were also identified in the first approach. Firstly, MitoProtII predicted the presence of a MTS in the two transcripts encoded by SPATA19. This prediction is in adequacy with previous reports using rats (Doiguchi et al., 2002b), mouse and human models (Doiguchi et al., 2002a; Matsuoka et al., 2004) showing the presence of a N-terminus sequence corresponding to a MTS. Secondly, 5 out of the 7 transcripts encoded by KIAA0100 were predicted to have a MTS using MitoProtII, and 1 out of the 7 transcripts was predicted to have a MTS using iPSORT. Again, this finding is consistent with a previous bioinformatics study, showing that KIAA0100 harbors 4 domains and one of them, located at N-terminus, is a MTS. This domain is already identified in the yeast mitochondrial protein FMP27 (Zhong et al., 2018).

However, our second approach did not identify the three other mitochondrial CTAs described in the first approach, COX6B2, FATE1 and GPAT2, because none of them harbor a MTS. This lack of concordance between the two applied approaches can be explained based on their sequence. Firstly, COX6B2, is one subunit of the complex IV that is imported into the mitochondria through the Mia40/CHCHD4 machinery. Thus, COX6B2 displays a (CX9C)₂ motif required for its import into mitochondria (Modjtahedi et al., 2016). Secondly, FATE1 is localized at the ER–mitochondria contacts. It was reported that FATE1 C-terminal

domain (aa 125–183) is sufficient for its targeting to mitochondria. Three basic residues within this C-terminal domain are essential for this localization (Doghman-Bouguerra et al., 2016). Finally, GPAT2 is localized at the mitochondrial outer membrane (MOM) and reported to have two transmembrane regions (sequences Ala306–Tyr332 and Val450–Leu472) required for its insertion in MOM and both N- and C-terminus are facing the cytosolic compartment (Nakagawa et al., 2012).

Beside these, among the identified 67 CTAs genes predicted to encode the 143 isoforms with a potential MTS, 33 have completely unknown functions, including 16 genes of the GAGE family. Conversely, 34 other CTAs have been partially characterized at the function level. Importantly, except KIAA0100 and SPATA19, none of these 67 mitoCTAs has yet been ascribed to a mitochondrial localization or function. Their involvement in mitochondrial physiology can only be inferred from the analysis of their primary protein sequence or from the characterized isoforms generated by the same genes but located in a different cell compartment. Indeed, in eukaryotic cells, one protein can be located in several organelles, a process termed dual targeting or dual localization. This phenomenon increases the number of cellular functions without increasing the number of genes. Several distinct mechanisms achieve this dual localization, such as mRNA alternate splicing leading to a specific transcript encoding a MTS, and alternative transcription initiation. In addition, a single protein sequence could mediate dual targeting into different compartments, a process termed ambiguous targeting signal. Indeed, targeting sequences meant for protein export in mitochondria, ER and chloroplasts, share common features, including the N-terminal position, the α -helical structure and the hydrophobicity (reviewed in (Yogev and Pines, 2011)). Finally, some proteins can harbor two distinct targeting signals, one at the N-terminus and another at the C-terminus. For example, in the 30 N-terminal amino acids of LpSOD, two targeting domains can be distinguished: the signal peptide (SP) and the transit peptide (TP). Also, LpSOD contains a potential type-1 peroxisome-targeting signal (PTS1) located at its C-terminus (Bodyl and Mackiewicz, 2007).

By reviewing the available data concerning the 34 mitoCTAs with known structure or function, we identified five clusters of processes. A first cluster of mitoCTAs consists of proteins acting on nuclear DNA maintenance. They include the PRM1 and PRM2 protamines that substitute for histones to stabilize the DNA, as well as HORMAD1 and HORMAD2 that release DNA constraints through double strand breaks. In addition, we identified, a set of proteins involved in the structure and organization of chromosomes such as, FMR1NB, SYCP1, SYCE1, BRDT, CTCFL and OIP5. Interestingly, the latter 4 mitoCTAs have only some alternative isoforms that are predicted to be imported into mitochondria. Whether these proteins also act on mitochondrial DNA structure and maintenance remains to be experimentally elucidated.

A second cluster includes 5 mitoCTAs (DDX43, MAEL, PIWIL1, PIWIL2 and RNF17) that are related to the RNA metabolism and in particularly Piwi-RNAs (piRNAs), for which a substantial mitochondria contribution in their processing has already been disclosed (Aravin and Chan, 2011). Importantly, for MAEL and PIWIL2, specific isoforms are present in both mitochondria and other cell compartments, as only one out of their three isoforms harbors an MTS. Thus, whether specific regulations of piRNAs by mitochondria are common between spermatogenesis and tumorigenesis remains to be elucidated.

A third cluster is related to genes possibly involved in the mitochondrial transport within the cell, based on their potential interaction with kinesin and dynein motors (Pilling et al., 2006). Three of these mitoCTAs are microtubule-dependent molecular motors that can be localized into mitochondria: SPEF2, a linker protein for dynein1 (Lehti et al., 2017), two isoforms of KIF2C, a kinesin-like protein and one isoform of SPAG4, which interacts with NESPRIN3 (Ji et al., 2018). In addition, some isoforms of ODF2 might also be restricted to mitochondria, although its function has been related to the biogenesis of centrosomes. These observations question the potential role of this group of mitoCTAs in mitochondrial dynamics and localization within the cell.

A fourth cluster involves CTAs potentially regulating cell signaling, and in particular the calcium fluxes at the contact sites between ER and mitochondria, MAMs, which are involved in Ca^{2+} signaling, lipid synthesis and mitochondrial biogenesis regulation (Rowland and Voeltz, 2012). Here, we identified 3 mitoCTAs: CALR3, a calcium-binding chaperone protein, CABYR, a calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated protein, and LIP1 a phospholipase that could be directed to the mitochondrial side of the MAMs to regulate calcium fluxes. The two first mitoCTAs are indispensable for the development of sperm fertilizing ability (Ikawa et al., 2011; Young et al., 2016), but only CABYR has been involved in tumorigenesis. Therefore, it will be interesting to track the localization of CALR3, CABYR and LIP1 in living cells and to assess their role in calcium signaling. Again, additional different CABYR isoforms could be located alternatively outside mitochondria, as only 3 out of its 7 isoforms are predicted to include a MTS.

Additional mitoCTAs, such as DCAF12, PRAME and TSPY1 could play a role in particular signaling processes in the mitochondria. For example, TSPY1 has been shown to regulate p53 levels, a protein that is also present in mitochondria.

A fifth cluster involves the TSAG10, SPAC13 and CTNNA2 genes, which play a role in sperm cell adhesion. However, their functions in mitochondria remain to be elucidated.

7. Discussion and open questions

In summary, with our two approaches, we identified 70 mitoCTAs among the 276 known CTAs: 67 CTAs predicted to harbor a MTS and 3 without a MTS. Their expression might be related to specific mitochondrial functions involved in spermatogenesis in physiological condition, and in tumorigenesis in a pathological condition. Initially, our hypothesis concerning the possible role of CTAs in mitochondria was based on the fact that both spermatogenesis and tumorigenesis involved a common major metabolic shift, requiring an adaptation of the respiratory chain to available substrates. Indeed, our findings suggest that complex IV of the respiratory chain modifies its subunits composition to adapt its efficacy and drive the production of ATP through the OXPHOS process, in order to consume the high amounts of lactate available in the microenvironment. However, this potential metabolic adaptation only involves two of our identified mitoCTAs: SPATA19 and COX6B2. Therefore, the many other mitoCTAs described here might foster equally important functions for spermatogenesis and tumorigenesis, such as the organization of the mitochondrial genome, the control of non-coding RNAs, as the piRNAs, and signaling pathways, mostly related to calcium fluxes between the ER and the mitochondria.

Thus, altogether, these processes could regulate the expression of the mitochondrial genome, the activity of mitochondrial matrix enzymes involved in the lactate catabolism and eventually regulate the whole cell metabolism required during cell proliferation, immortalization, invasion and migration. If some of these processes have already been associated to spermatogenesis, such as the piRNA turn-over, their involvement in the metabolic adaptations in tumorigenesis and spermatogenesis remains to be elucidated. Ultimately, the contribution of many mitoCTAs to modulations in mitochondrial membranes' shape and composition, as well as to the cellular distribution of mitochondria during spermatogenesis and cancer development should be further investigated.

To conclude, all these predicted data generate a tremendous number of questions on mitoCTAs, and the following three challenges should help in understanding their precise roles in the cell:

The first one consists in determining the precise cellular localization of mitoCTAs. Indeed, among them, only 5 have been proven to act on mitochondrial functions, while other are predicted to harbor a MTS by at least one of the four prediction tools we used. This implies that the first obvious task to address in the future consists in determining the precise localization of all mitoCTAs identified here. Thus, we could refine the listing of the true mitoCTAs and define in which mitochondrial sub-

compartment they exert their functions.

The second challenge is to unravel the function of each mitoCTAs in mitochondrial physiology and their interaction with the microenvironment. This is a key process in understanding why mitoCTAs are crucial during spermatogenesis and cancer development. Moreover, it should shed light on unexpected mitochondrial particularities that are restricted to germ and cancer cells and absent in somatic cells.

The last challenge is to understand how the expression of mitoCTAs is controlled, by defining the timing of expression for each mitoCTA during the different stages of spermatogenesis and tumorigenesis, and by understanding how the biosynthesis and stability of their mRNAs is regulated at the molecular level.

Together, these data should bring insights on novel mitochondrial functions that are specific to germ and tumor cells. Importantly, this should provide new targets for the design of specific cancer treatments that will not affect the integrity of somatic cells.

CRedit authorship contribution statement

Jade Aurière: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Software, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **David Goudenege:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Software. **Olivier R. Baris:** Writing - review & editing. **Magalie Boguenet:** Data curation, Investigation, Writing - review & editing. **Pascale May-Panloup:** Writing - review & editing. **Guy Lenaers:** Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Supervision, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Salim Khiati:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Software, Supervision, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We acknowledge Dr. Layon for promoting scientific discussions and Sheena M Aris, Shar-Yin N Huang and Brunilde M. Gril for the critical reading of the manuscript.

Funding

This work was supported by the Université d'Angers, CHU d'Angers, the Région Pays de la Loire and Angers Loire Métropole.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.11.002>.

References

- Almagro Armenteros, J.J., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., von Heijne, G., Elofsson, A., Nielsen, H., 2019. Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Sci. Alliance* 2, e201900429. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900429>.
- Almeida, L.G., Sakabe, N.J., deOliveira, A.R., Silva, M.C.C., Mundstein, A.S., Cohen, T., Chen, Y.-T., Chua, R., Gurung, S., Gnjatich, S., Jungbluth, A.A., Caballero, O.L., Bairoch, A., Kiesler, E., White, S.L., Simpson, A.J.G., Old, L.J., Camargo, A.A., Vasconcelos, A.T.R., 2009. CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. *Nucleic Acids Res.* 37, D816–D819. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn673>.

- Andrade, V.C.C., Vettore, A.L., Felix, R.S., Almeida, M.S.S., de Carvalho, F., de Oliveira, J.S.R., Chauffaille, M. de L.L.F., Andriolo, A., Caballero, O.L., Zago, M.A., Colleoni, G.W.B., 2008. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immunol. J. Acad. Cancer Immunol.* 8.
- Aoki, N., Mochizuki, K., Matsui, Y., 2017. DNA methylation of the Fthl17 5'-upstream region regulates differential Fthl17 expression in lung cancer cells and germline stem cells. *PLoS ONE* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172219>.
- Aravin, A.A., Chan, D.C., 2011. piRNAs Meet Mitochondria. *Dev. Cell* 20, 287–288. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.03.003>.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G., 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25, 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>.
- Babatunde, K.A., Najafi, A., Salehipour, P., Modarresi, M.H., Mobasheri, M.B., 2017. Cancer/Testis genes in relation to sperm biology and function. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 20, 967–974. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.9259>.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K., Miyano, S., 2002. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18, 298–305. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.2.298>.
- Barrow, C., 2006. Tumor Antigen Expression in Melanoma Varies According to Antigen and Stage. *Clin. Cancer Res.* 12, 764–771. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1544>.
- Bera, T.K., Huynh, N., Maeda, H., Sathyanarayana, B.K., Lee, B., Pastan, I., 2004. Five POTE paralogs and their splice variants are expressed in human prostate and encode proteins of different lengths. *Gene* 337, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.05.009>.
- Bodyl, A., Mackiewicz, P., 2007. Analysis of the targeting sequences of an iron-containing superoxide dismutase (SOD) of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* suggests function in multiple cellular compartments. *Arch. Microbiol.* 187, 281–296. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0194-5>.
- Boussouar, F., Benahmed, M., 2004. Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.07.003>.
- Brinkmann, U., Vasmatzis, G., Lee, B., Yerushalmi, N., Essand, M., Pastan, I., 1998. PAGE-1, an X chromosome-linked GAGE-like gene that is expressed in normal and neoplastic prostate, testis, and uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10757–10762.
- Calvo, S.E., Clauser, K.R., Mootha, V.K., 2016. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res.* 44, D1251–D1257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1003>.
- Carrero-Valenzuela, R.D., Quan, F., Lightowlers, R., Kennaway, N.G., Litt, M., Forte, M., 1991. Human cytochrome c oxidase subunit VIb: characterization and mapping of a multigene family. *Gene* 102, 229–236. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90082-M](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90082-M).
- Chen, Y.-T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Türeci, Ö., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfirsch, M., Old, L.J., 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1914–1918.
- Chen, Y.-T., Scanlan, M.J., Venditti, C.A., Chua, R., Theiler, G., Stevenson, B.J., Iseli, C., Gure, A.O., Vasicek, T., Strausberg, R.L., Jongeneel, C.V., Old, L.J., Simpson, A.J.G., 2005. Identification of cancer/testis-antigen genes by massively parallel signature sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7940–7945. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502583102>.
- Cheng, C.-C., Wooten, J., Gibbs, Z.A., McGlynn, K., Mishra, P., Whitehurst, A.W., 2020. Sperm-specific COX6B2 enhances oxidative phosphorylation, proliferation, and survival in human lung adenocarcinoma. *eLife* 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.58108>.
- Cheng, Y.-H., Wong, E.W., Cheng, C.Y., 2011. Cancer/testis (CT) antigens, carcinogenesis and spermatogenesis. *Spermatogenesis* 1, 209–220. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.3.17990>.
- Claros, M.G., Vincens, P., 1996. Computational Method to Predict Mitochondrially Imported Proteins and their Targeting Sequences. *Eur. J. Biochem.* 241, 779–786. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00779.x>.
- Cui, H., Lan, X., Lu, S., Zhang, F., Zhang, W., 2017. Bioinformatic prediction and functional characterization of human KIAA0100 gene. *J. Pharm. Anal.* 7, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.09.003>.
- Doghman-Bouguerra, M., Finetti, P., Durand, N., Parise, I.Z.S., Sberia, S., Cantini, G., Canu, L., Hescot, S., Figueiredo, M.M.O., Komechu, H., Sberia, I., Nesi, G., Paci, A., Al Ghuzlan, A., Birnbaum, D., Baudin, E., Luconi, M., Fassnacht, M., Figueiredo, B.C., Bertucci, F., Lalli, E., 2020. Cancer-testis Antigen FATE1 Expression in Adrenocortical Tumors Is Associated with a Pervasive Autoimmune Response and Is a Marker of Malignancy in Adult, but Not Children. *ACC. Cancers* 12, 689. <https://doi.org/10.3390/cancers12030689>.
- Doghman-Bouguerra, M., Granatiero, V., Sberia, S., Sberia, I., Lucas-Gervais, S., Brau, F., Fassnacht, M., Rizzuto, R., Lalli, E., 2016. FATE1 antagonizes calcium- and drug-induced apoptosis by uncoupling ER and mitochondria. *EMBO Rep.* 17, 1264–1280. <https://doi.org/10.15252/embr.201541504>.
- Doiguchi, M., Mori, T., Toshimori, K., Shibata, Y., Iida, H., 2002a. Spergen-1 Might Be an Adhesive Molecule Associated with Mitochondria in the Middle Piece of Spermatozoa. *Dev. Biol.* 252, 127–137. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0833>.
- Doiguchi, M., Yamashita, H., Ichinose, J., Mori, T., Shibata, Y., Iida, H., 2002b. Complementary DNA Cloning and Characterization of Rat spergen-1, a Spermatogenic Cell-Specific Gene-1, Containing a Mitochondria-Targeting Signal. *Biol. Reprod.* 66, 1462–1470. <https://doi.org/10.1095/bioreprod66.5.1462>.

- Feron, O., 2009. Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother. Oncol.* 92, 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.06.025>.
- Fiedler, S.E., Dudiki, T., Vijayaraghavan, S., Carr, D.W., 2013. Loss of R2D2 Proteins ROPN1 and ROPN1L Causes Defects in Murine Sperm Motility, Phosphorylation, and Fibrous Sheath Integrity. *Biol. Reprod.* 88 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.105262>.
- Fukasawa, Y., Tsuji, J., Fu, S.-C., Tomii, K., Horton, P., Imai, K., 2015. MitoFates: Improved Prediction of Mitochondrial Targeting Sequences and Their Cleavage Sites. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 14, 1113–1126. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.043083>.
- Gallegos, Z.R., Taus, P., Gibbs, Z.A., McGlynn, K., Gomez, N.C., Davis, I., Whitehurst, A.W., 2019. EWSR1-FLI1 Activation of the Cancer/Testis Antigen FATE1 Promotes Ewing Sarcoma Survival. *Mol. Cell. Biol.* 39 <https://doi.org/10.1128/MCB.00138-19>.
- Garcia-Fabiani, M.B., Montanaro, M.A., Stringa, P., Lacunza, E., Cattaneo, E.R., Santana, M., Pellon-Maison, M., Gonzalez-Baro, M.R., 2017. Glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 is essential for normal spermatogenesis. *Biochem. J.* 474, 3093–3107. <https://doi.org/10.1042/BCJ20161018>.
- Ghafari-Fard, S., Abbasi, A., Moslehi, H., Faramarzi, N., Taba taba Vakili, S., Mobasheri, M.B., Modarresi, M.H., 2010a. Elevated expression levels of testis-specific genes TEX101 and SPATA19 in basal cell carcinoma and their correlation with clinical and pathological features. *Br. J. Dermatol.* 162, 772–779. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09568.x>.
- Ghafari-Fard, S., Soudéh, Ousati Ashtiani, Z., Sabah Golian, B., Hasheminasab, S.-M., Modarresi, M.H., 2010b. Expression of Two Testis-specific Genes, SPATA19 and LEMD1, in Prostate Cancer. *Arch. Med. Res.* 41, 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2010.04.003>.
- Gjerstorff, M.F., Andersen, M.H., Ditzel, H.J., 2015. *Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy.* *Oncotarget* 6, 15772–15787.
- Guo, J., Wang, M., Liu, X., 2015. MicroRNA-195 suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting BCOX1 in prostate carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 34 <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0209-7>.
- Han, C., Kwon, J.T., Park, I., Lee, B., Jin, S., Choi, H., Cho, C., 2010. Impaired sperm aggregation in Adam2 and Adam3 null mice. *Fertil. Steril.* 93, 2754–2756. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.03.013>.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- Hartmann, S., Zwick, L., Maurus, K., Fuchs, A.R., Brands, R.C., Seher, A., Kübler, A.C., Müller-Richter, U.D.A., 2018a. Melanoma-associated antigen A11 reduces erlotinib and afatinib efficacy in head and neck cancer. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* 46, 492–497. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.12.014>.
- Hartmann, S., Zwick, L., Scheurer, M.J.J., Fuchs, A.R., Brands, R.C., Seher, A., Böhm, H., Kübler, A.C., Müller-Richter, U.D.A., 2018b. MAGE-A11 expression contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer. *CLIN. Oral Investig.* 22, 1477–1486. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2242-8>.
- Hofmann, O., Caballero, O.L., Stevenson, B.J., Chen, Y.-T., Cohen, T., Chua, R., Maher, C. A., Panji, S., Schaefer, U., Kruger, A., Lehvaslaiho, M., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Jongeneel, C.V., Simpson, A.J.G., Old, L.J., Hide, W., 2008. Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20422–20427. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810777105>.
- Z. Huang C.V. Whelan D. Dechmann E.C. Teeling Genetic variation between long-lived versus short-lived bats illuminates the molecular signatures of longevity Aging. <https://2020.doi.org/10.18632/aging.103725>.
- Hüttemann, M., Jaradat, S., Grossman, L.I., 2003. Cytochrome c oxidase of mammals contains a testes-specific isoform of subunit VIb—the counterpart to testes-specific cytochrome c? *Mol. Reprod. Dev.* 66, 8–16. <https://doi.org/10.1002/mrd.10327>.
- Ikawa, M., Tokuiro, K., Yamaguchi, R., Benham, A.M., Tamura, T., Wada, I., Satoh, Y., Inoue, N., Okabe, M., 2011. Calsperin Is a Testis-specific Chaperone Required for Sperm Fertility. *J. Biol. Chem.* 286, 5639–5646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.140152>.
- Y. Ji J. Jiang L. Huang W. Feng Z. Zhang L. Jin X. Xing Sperm-associated antigen 4 (SPAG4) as a new cancer marker interacts with Nesprin3 to regulate cell migration in lung carcinoma 2018 Rep Oncol 10.3892/or.2018.6473.
- Kim, E., Yamashita, M., Nakanishi, T., Park, K.-E., Kimura, M., Kashiwabara, S., Baba, T., 2006. Mouse Sperm Lacking ADAM1b/ADAM2 Fertilin Can Fuse with the Egg Plasma Membrane and Effect Fertilization. *J. Biol. Chem.* 281, 5634–5639. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510558200>.
- Kuramochi-Miyagawa, S., 2004. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 131, 839–849. <https://doi.org/10.1242/dev.00973>.
- Laduron, S., Deplus, R., Zhou, S., Kholmanskikh, O., Godelaine, D., De Smet, C., Hayward, S.D., Fuks, F., Boon, T., De Plaen, E., 2004. MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Res.* 32 <https://doi.org/10.1093/nar/gkh735>.
- Lehti, M.S., Zhang, F.-P., Kotaja, N., Sironen, A., 2017. SPEG2 functions in microtubule-mediated transport in elongating spermatids to ensure proper male germ cell differentiation. *Development* 144, 2683–2693. <https://doi.org/10.1242/dev.152108>.
- Liu, T., Zhang, X.-Y., He, X.-H., Geng, J.-S., Liu, Y., Kong, D.-J., Shi, Q.-Y., Liu, F., Wei, W., Pang, D., 2014. High Levels of BCOX1 Expression Are Associated with Poor Prognosis in Patients with Invasive Ductal Carcinomas of the Breast. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086952>.
- Liu, X., Tang, H., Zhang, Z., Li, W., Wang, Z., Zheng, Y., Wu, M., Li, G., 2011. POTEH hypomethylation, a new epigenetic biomarker for glioma prognosis. *Brain Res.* 1391, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.03.042>.
- Loriot, A., Boon, T., Smet, C.D., 2003. Five new human cancer-germline genes identified among 12 genes expressed in spermatogenesis. *Int. J. Cancer* 105, 371–376. <https://doi.org/10.1002/ijc.11104>.
- Mannan, A.U., Nayernia, K., Mueller, C., Burfeind, P., Adham, I.M., Engel, W., 2003. Male Mice Lacking the Theg (Testicular Haploid Expressed Gene) Protein Undergo Normal Spermatogenesis and Are Fertile. *Biol. Reprod.* 69, 788–796. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017400>.
- Matsuoka, Y., Iguchi, N., Kitamura, K., Nishimura, H., Manabe, H., Miyagawa, Y., Koga, M., Matsumiya, K., Okuyama, A., Tanaka, H., Nishimune, Y., 2004. Cloning and characterization of a mouse spergen-1 localized in sperm mitochondria. *Int. J. Androl.* 27, 152–160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2004.00466.x>.
- Maxfield, K.E., Taus, P.J., Corcoran, K., Wooten, J., Macion, J., Zhou, Y., Borromeo, M., Kollipara, R.K., Yan, J., Xie, Y., Xie, X.-J., Whitehurst, A.W., 2015. Comprehensive functional characterization of cancer–testis antigens defines obligate participation in multiple hallmarks of cancer. *Nat. Commun.* 6 <https://doi.org/10.1038/ncomms9840>.
- Meuwissen, R.L.J., Meerts, I., Hoovers, J.M.N., Leschot, N.J., Heyting, C., 1997. Human Synaptonemal Complex Protein 1 (SCP1): Isolation and Characterization of the cDNA and Chromosomal Localization of the Gene. *Genomics* 39, 377–384. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.4373>.
- Mi, Y., Shi, Z., Li, J., 2015. Spata19 is critical for sperm mitochondrial function and male fertility. *Mol. Reprod. Dev.* 82, 907–913. <https://doi.org/10.1002/mrd.22536>.
- Modjtahedi, N., Tokatlidis, K., Dessen, P., Kroemer, G., 2016. Mitochondrial Proteins Containing Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix (CHCH) Domains in Health and Disease. *Trends Biochem. Sci.* 41, 245–260. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.004>.
- Nakagawa, T., Harada, N., Miyamoto, A., Kawanishi, Y., Yoshida, M., Shono, M., Mawatari, K., Takahashi, A., Sakaue, H., Nakaya, Y., 2012. Membrane topology of murine glycerol-3-phosphate acyltransferase 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418, 506–511. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.055>.
- Neto, F.T.L., Bach, P.V., Najari, B.B., Li, P.S., Goldstein, M., 2016. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin. Cell Dev. Biol. Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* 59, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.04.009>.
- Nie, K., Li, J., He, X., Wang, Y., Zhao, Q., Du, M., Sun, H., Wang, J., Lyu, J., Fang, H., Jin, L., 2020. COX6B2 drives metabolic reprogramming toward oxidative phosphorylation to promote metastasis in pancreatic ductal cancer cells. *Oncogenesis* 9. <https://doi.org/10.1038/s41389-020-0231-2>.
- Pellon-Maison, M., Montanaro, M.A., Lacunza, E., Garcia-Fabiani, M.B., Soler-Gerino, M. C., Cattaneo, E.R., Quiroga, I.Y., Abba, M.C., Coleman, R.A., Gonzalez-Baro, M.R., 2014. Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase-2 Behaves as a Cancer Testis Gene and Promotes Growth and Tumorigenicity of the Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Line. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100896>.
- Pilling, A.D., Horiuchi, D., Lively, C.M., Saxton, W.M., 2006. Kinesin-1 and Dynein Are the Primary Motors for Fast Transport of Mitochondria in *Drosophila* Motor Axons. *Mol. Biol. Cell* 17, 2057–2068. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0526>.
- Ramallo-Santos, J., Varum, S., Amaral, S., Mota, P.C., Sousa, A.P., Amaral, A., 2009. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum. Reprod. Update* 15, 553–572. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp016>.
- Rato, L., Alves, M.G., Socorro, S., Duarte, A.I., Cavaco, J.E., Oliveira, P.F., 2012. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat. Rev. Urol.* 9, 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.77>.
- Reuter, M., Chuma, S., Tanaka, T., Franz, T., Stark, A., Pillai, R.S., 2009. Loss of the Mili-interacting Tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 639–646. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1615>.
- Roise, D., 1997. Recognition and binding of mitochondrial presequences during the import of proteins into mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29, 19–27. <https://doi.org/10.1023/a:1022403604273>.
- Rowland, A.A., Voeltz, G.K., 2012. Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 607–625. <https://doi.org/10.1038/nrm3440>.
- Russell, L.D., Ren, H.P., Sinha Hikim, I., Schulze, W., Sinha Hikim, A.P., 1990. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am. J. Anat.* 188, 21–30. <https://doi.org/10.1002/aja.1001880104>.
- Ruzzenenti, P., Asperti, M., Mitola, S., Crescini, E., Maccarinelli, F., Gryzik, M., Regoni, M., Finazzi, D., Arosio, P., Poli, M., 2015. The Ferritin-Heavy-Polypeptide-Like-17 (FTHL17) gene encodes a ferritin with low stability and no ferroxidase activity and with a partial nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1850, 1267–1273. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.02.016>.
- Satie, A.-P., Rajpert-De Meyts, E., Spagnoli, G.C., Henno, S., Olivo, L., Jacobsen, G.K., Rioux-Leclercq, N., Jégou, B., Samson, M., 2002. The Cancer-Testis Gene, NY-ESO-1, Is Expressed in Normal Fetal and Adult Testes and in Spermatocytic Seminomas and Testicular Carcinoma In Situ. *Lab. Invest.* 82, 775–780. <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000017169.26718.5F>.
- Scanlan, M.J., Gure, A.O., Jungbluth, A.A., Old, L.J., Chen, Y.-T., 2002. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* 188, 22–32. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2002.18803.x>.
- Shimamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Daiba, A., Chuma, S., Katanaya, T., Katsumata, A., Nishimura, K., Ohtaka, M., Nakanishi, M., Nakamura, T., Yoshinaga, K., Asada, N., Nakamura, S., Yasunaga, T., Kojima-Kita, K., Itou, D., Kimura, T., Nakano, T., 2013. GPAT2, a mitochondrial outer membrane protein, in

- piRNA biogenesis in germline stem cells. *RNA* 19, 803–810. <https://doi.org/10.1261/rna.038521.113>.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., Meisinger, C., 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 13207–13212. <https://doi.org/10.1073/pnas.2135385100>.
- Simpson, A.J.G., Caballero, O.L., Jungbluth, A., Chen, Y.-T., Old, L.J., 2005. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5, 615–625. <https://doi.org/10.1038/nrc1669>.
- Smith, A.C., Robinson, A.J., 2016. MitoMiner v3.1, an update on the mitochondrial proteomics database. *Nucleic Acids Res.* 44, D1258–D1261. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1001>.
- Song, J., Yang, W., Shih, I.-M., Zhang, Z., Bai, J., 2006. Identification of BCOX1, a novel gene overexpressed in breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1760, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.09.017>.
- Stoop, H., van Gorp, R., de Krijger, R., van Kessel, A.G., Köberle, B., Oosterhuis, W., Looijenga, L., 2001. Reactivity of Germ Cell Maturation Stage-Specific Markers in Spermatocytic Seminoma: Diagnostic and Etiological Implications. *Lab. Invest.* 81, 919–928. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780302>.
- Su, S., Gu, Q., Xu, A., Shen, S., Liu, S., Zhang, C., Miao, C., Qin, C., Liu, B., Wang, Z., 2019. Genetic variations in MAGE-A11 predict the risk and survival of renal cell cancer. *J. Cancer* 10, 4860–4865. <https://doi.org/10.7150/jca.32675>.
- Suzuki, T., Kosaka-Suzuki, N., Pack, S., Shin, D.-M., Yoon, J., Abdullaev, Z., Pugacheva, E., Morse, H.C., Loukinov, D., Lobanenkov, V., 2010. Expression of a Testis-Specific Form of Gal3st1 (CST), a Gene Essential for Spermatogenesis, Is Regulated by the CTCF Paralogous Gene BORIS. *Mol. Cell. Biol.* 30, 2473–2484. <https://doi.org/10.1128/MCB.01093-09>.
- Takahashi, K., Shichijo, S., Noguchi, M., Hirohata, M., Itoli, K., 1995. Identification of MAGE-1 and MAGE-4 Proteins in Spermatogonia and Primary Spermatoocytes of Testis 6.
- The Gene Ontology Resource, 2019. 20 years and still GOING strong. *Nucleic Acids Res.* 47, D330–D338. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1055>.
- Thomas, R., Al-Khadairi, G., Roelands, J., Hendrickx, W., Dermime, S., Bedognetti, D., Decock, J., 2018. NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives. *Front. Immunol.* 9 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00947>.
- M. Uhlen L. Fagerberg B.M. Hallstrom C. Lindskog P. Oksvold A. Mardinoglu A. Sivertsson C. Kampf E. Sjostedt A. Asplund I. Olsson K. Edlund E. Lundberg S. Navani C.A.-K. Szizyarto J. Odeberg D. Djureinovic J.O. Takanen S. Hober T. Alm P.-H. Edqvist H. Berling H. Tegel J. Mulder J. Rockberg P. Nilsson J.M. Schwenk M. Hamsten K. von Feilitzen M. Forsberg L. Persson F. Johansson M. Zwahlen G. von Heijne J. Nielsen F. Ponten Tissue-based map of the human proteome *Science* 347 2015 1260419 1260419 10.1126/science.1260419.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., Boon, T., 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643–1647. <https://doi.org/10.1126/science.1840703>.
- Van Tongelen, A., Lorient, A., De Smet, C., 2017. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Lett.* 396, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.03.029>.
- Vansteenkiste, J.F., Cho, B.C., Vanakesa, T., De Pas, T., Zielinski, M., Kim, M.S., Jasse, J., Yoshimura, M., Dahabreh, J., Nakayama, H., Havel, L., Kondo, H., Mitsudomi, T., Zarogoulidis, K., Gladkov, O.A., Udud, K., Tada, H., Hoffman, H., Bugge, A., Taylor, P., Gonzalez, E.E., Liao, M.L., He, J., Pujol, J.-L., Louahed, J., Debois, M., Brichard, V., Debruyne, C., Therasse, P., Altorki, N., 2016. Efficacy of the MAGE-A3 cancer immunotherapeutic as adjuvant therapy in patients with resected MAGE-A3-positive non-small-cell lung cancer (MAGRIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 17, 822–835. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)00099-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)00099-1).
- Vrielynck, N., Chambon, A., Vezon, D., Pereira, L., Chelysheva, L., De Muys, A., Mezdard, C., Mayer, C., Grelon, M., 2016. A DNA topoisomerase VI-like complex initiates meiotic recombination. *Science* 351, 939–943. <https://doi.org/10.1126/science.1251996>.
- Wang, J., Wang, H., Hou, W., Liu, H., Zou, Y., Zhang, H., Hou, L., McNutt, M.A., Zhang, B., 2013. Subnuclear distribution of SSX regulates its function. *Mol. Cell. Biochem.* 381, 17–29. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1684-9>.
- Whitehurst, A.W., 2014. Cause and Consequence of Cancer/Testis Antigen Activation in Cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 54, 251–272. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140326>.
- Wong, K.K., Hussain, F.A., Loo, S.K., López, J.L., 2017. Cancer/testis antigen SPATA19 is frequently expressed in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *APMIS* 125, 1092–1101. <https://doi.org/10.1111/apm.12775>.
- Xia, L.-P., Xu, M., Chen, Y., Shao, W.-W., 2013. Expression of MAGE-A11 in breast cancer tissues and its effects on the proliferation of breast cancer cells. *Mol. Med. Rep.* 7, 254–258. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.1126>.
- Xu, Z., Wu, Z., Zhang, J., Zhou, R., Ye, L., Yang, P., Yu, B., 2020. Development and validation of an oxidative phosphorylation-related gene signature in lung adenocarcinoma. *Epigenomics* 12, 1333–1348. <https://doi.org/10.2217/epi-2020-0217>.
- Yogev, O., Pines, O., 2011. Dual targeting of mitochondrial proteins: Mechanism, regulation and function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1808, 1012–1020. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2010.07.004>.
- Young, S.A.M., Miyata, H., Satouh, Y., Aitken, R.J., Baker, M.A., Ikawa, M., 2016. CABYR is essential for fibrous sheath integrity and progressive motility in mouse spermatozoa. *J. Cell Sci.* 129, 4379–4387. <https://doi.org/10.1242/jcs.193151>.
- Zamuner, F.T., Karia, B.T.R., de Oliveira, C.Z., dos Santos, C.R., Carvalho, A.L., Vettore, A.L., 2015. A Comprehensive Expression Analysis of Cancer Testis Antigens in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals MAGEA3/6 as a Marker for Recurrence. *Mol. Cancer Ther.* 14, 828–834. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0796>.
- Zhong, Z., Panu, V., Rosenow, M., Stark, A., Spetzler, D., 2018. KIAA0100 Modulates Cancer Cell Aggression Behavior of MDA-MB-231 through Microtubule and Heat Shock Proteins. *Cancers* 10. <https://doi.org/10.3390/cancers10060180>.

6.2. CT55

CT55 est, comme son nom l'indique, le 55^e CTA à avoir été identifié, et ceci grâce à une analyse bioinformatique de la région q26-28 du chromosome X. Cette région regroupe 47 gènes codant pour des CTA, principalement des membres des familles MAGE-A, SPANX et NY-ESO-1. L'analyse moléculaire de cette région a permis d'identifier un nouveau membre, en 2004, alors nommé : BJ-HCC-20. Son profil d'expression d'ARNm correspondait aux critères d'inclusion de la famille des CTA, à savoir restreint aux testicules en condition physiologie, et présent dans des cancers hépatocellulaire, colorectal, gastrique et pulmonaire non à petites cellules (Dong et al., 2004). Depuis cette description initiale, la littérature concernant CT55 reste rare, notamment concernant ses fonctions cellulaires.

Les différentes appellations de CT55 sont BJ-HCC-20, CXorf48 et CT55 (*Cancer/Testis Antigen 55*). CT55 génère deux transcrits codant deux isoformes : un isoforme long de 264 acides aminés (aa), nommé CT55.1a selon la nomenclature de la base de données des CTA et un isoforme court de 242 aa nommé CT55.1b. Le second isoforme présente une rétention de l'intron 5-6, qui induit l'apparition d'un codon stop UAA et donc un isoforme raccourci de 22 acides aminés (Fig.17).

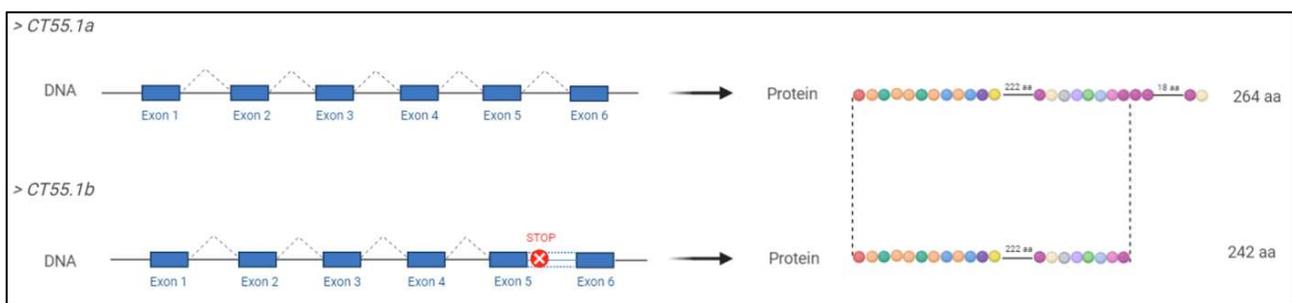


Figure 17 : Schéma représentant les structures génomique et protéique des deux isoformes de CT55 : CT55.1a et CT55.1b. CT55.1a est composé de 6 exons. CT55.1b est composé de 5 exons. La séquence du 5^e exon de CT55.1b est issue d'une rétention de l'intron entre les exons 5 et 6 de CT55.1a, induisant l'apparition d'un codon STOP (TAA) et donc une protéine raccourcie. La protéine CT55.1a possède 264 aa et CT55.1b possède 242aa, tronquée de 22 aa en position C-terminale.

6.2.1. Expression dans les tissus cancéreux

Si la protéine a été très peu étudiée, son profil d'expression dans divers cancers a été évalué à plusieurs reprises dans le but de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, l'expression de CT55 a été associée à un mauvais pronostic du cancer des voies aérodigestives supérieures (VADS). Alors que les CTA avaient été décrits comme exprimés dans un certain nombre de cancers, très peu de données étaient présentes concernant leur expression dans les cancers des VADS pour lesquels les avancées thérapeutiques étaient rares ces dernières années. Sur les 139 CTA présents dans la base de données en 2015, l'expression de 36 d'entre eux, sélectionnés par des études *in vitro*, a été analysée sur 89 échantillons de patients en comparaison à des échantillons de muqueuse saine. Les auteurs ont pu montrer que 85,4% des échantillons de patients atteints de cancer des VADS présentaient l'expression d'au moins l'un des CTA suivants : MAGEB2, MAGEA, MAGEB6, SPANX-CD et CT55 et que 3 d'entre eux dont CT55 étaient corrélés à un mauvais pronostic. De plus, l'expression de CT55 a été corrélée

à une invasion lymphovasculaire et périneurale chez les patients, deux paramètres cliniques connus pour être des facteurs de mauvais pronostic (Zamunér et al., 2015).

CT55 a également été étudié en tant que cible thérapeutique dans un autre cancer : la leucémie myéloïde chronique. Même si les inhibiteurs de tyrosine kinase, les traitements utilisés actuellement, ont amélioré la survie des patients, il est fréquent d'observer une récurrence chez plus de la moitié d'entre eux. Pour l'autre moitié, dont la rémission est due à une réponse moléculaire complète, les mécanismes ne sont pas encore connus bien qu'une implication du système immunitaire est suggérée. Le but était donc de déterminer un épitope de cellule T dérivé d'un antigène qui serait à terme une cible thérapeutique pour éliminer les cellules souches résistantes au traitement qui entraînent des rechutes chez les patients. Après avoir observé une forte expression de CT55 dans les lignées cellulaires leucémiques ainsi que chez les patients, les auteurs ont détecté un peptide dérivé de CT55 capable de conduire les lymphocytes T cytotoxiques à reconnaître les cellules souches leucémiques. De plus, ces lymphocytes T spécifiques ont été retrouvés uniquement chez les patients en rémission, indiquant qu'une immunothérapie ciblant les antigènes, dont CT55, de ces cellules souches résistantes serait l'une des stratégies qui pourrait être mise en place (Matsushita et al., 2017) .

Une autre étude a porté sur l'étude d'expression de plusieurs CTA dans le cancer colorectal (CRC). Cette étude s'est concentrée sur 18 CTA dont certains avaient déjà été identifiés dans le CRC et de nouveaux candidats, dont CT55. Malgré une expression retrouvée dans plusieurs lignées cellulaires colorectales, il n'a pas été démontré de corrélation entre la progression de la pathologie et l'expression de CT55 chez les 45 patients inclus (Tarnowski et al., 2016).

6.2.2. Fonction cellulaire ?

Outre son expression dans différents types de cancers le définissant comme un CTA, la fonction cellulaire de CT55 demeure inconnue. En 2008, il a été montré que l'isoforme CT55.1a interagirait avec une région très conservée de la protéine BRCA2. Deux modèles *in vitro* complémentaires ont été utilisés : une transfection de plasmide CT55.1a-GFP dans des cellules HeLa et une diminution drastique de son expression dans des cellules U2OS. Ces deux approches ont montré que la sur-expression de CT55 induit une augmentation de la prolifération cellulaire et qu'à l'inverse, sa sous-expression induit une induction d'apoptose en réponse à des dommages à l'ADN. Donc, de part son interaction avec BRCA2, CT55 serait impliqué dans la croissance cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Tomiyoshi et al., 2008).

Très récemment, l'étude d'un sous-type de cancer colorectal (CRC) inflammatoire : le *Colitis-Associated Cancer* (CAC) a conduit à l'identification de l'implication de CT55 dans une voie inflammatoire. Le CAC étant un cancer associé à une forte inflammation, l'identification de molécules ciblant NFκB permettrait d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, dont éventuellement CT55. En effet, dans un modèle AOM/DSS (azoxymethane/dextran sodium sulphate) d'induction de CAC chez des souris wild-type et KO pour CT55 il a été observé que les souris KO présentaient moins de tumeurs et de plus petite taille que les sauvages, et que les souris KO présentaient une réduction de la prolifération cellulaire et de l'inflammation. L'analyse du mécanisme a montré que CT55

pouvait activer la voie de signalisation NF- κ B induite par TNF α , en interagissant avec le complexe inhibiteur de NF- κ B: le complexe IKK (Inhibitory NF- κ B Kinase). Ainsi, le blocage du complexe IKK par CT55, maintiendrait NF- κ B activé, induisant une tumorigenèse importante en stimulant la prolifération cellulaire et l'angiogenèse, indispensable à l'inflammation et au développement métastatique du CAC (Zhao et al., 2019).

Ceci étant, aucune information n'est disponible sur la localisation et la fonction de CT55 en situation pathologique de tumorigenèse, ni sur son rôle physiologique lors de la spermatogenèse.

Ainsi, mes objectifs de thèse ont consisté à :

- 1) confirmer la corrélation entre l'expression de CT55 et l'abondance de l'ADN mitochondrial**
- 2) analyser son expression physiologique et pathologique**
- 3) déterminer sa localisation au sein de la cellule**
- 4) appréhender sa fonction cellulaire**

Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de cellules cancéreuses de mélanome, les UACC62 (University of Arizona Cell Culture 62). En effet, l'expression de la protéine n'est pas ubiquitaire et parmi les 1457 lignées cellulaires de CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia), il s'agit de la lignée qui présente l'expression la plus importante de CT55. De plus, pour étudier les mécanismes dans lesquels CT55 pouvait être impliqué, nous avons traité les cellules avec des siARN afin de diminuer l'expression de CT55 et d'observer l'impact de l'absence de la protéine pour les cellules.

Résultats

1. CT55 régule le nombre de copies d'ADN mitochondrial et maintient la prolifération cellulaire

1.1. Introduction

Depuis leur découverte en 1997, les Cancer/Testis Antigen présentent un intérêt croissant pour le traitement des cancers, compte tenu de leurs profils d'expression très particuliers. Néanmoins, la fonction cellulaire de plus de la moitié des CTAs n'est pas caractérisée. A partir des 276 gènes CTAs répertoriés à ce jour, nous en avons identifié 67 gènes qui codent potentiellement pour un isoforme mitochondrial. Parmi ceux-ci, CT55 code pour deux isoformes avec une MTS, suggérant une fonction mitochondriale.

Par ailleurs, les résultats de l'analyse de la banque de donnée NCI-60, croisant les données de transcriptomique avec l'évaluation de la quantité d'ADN mitochondrial présent dans chaque lignées a identifié CT55 comme le second gène dont l'expression est la plus corrélée au nombre de copie de l'ADNmt.

Dans le travail présenté ci-après sous la forme d'une publication en voie de soumission à Journal of Cell Science, nous abordons ces différents aspects, avec la volonté de confirmer la corrélation entre CT55 et l'abondance de l'ADNmt, de localiser précisément la protéine et les déterminants moléculaires associés, et les conséquences du silencing de CT55 sur la prolifération cellulaire.

Cancer/Testis Antigen 55 is required for mitochondrial DNA maintenance and cell proliferation in cancer.

Jade Aurrière¹, David Goudenege¹, Simone A Baechler³, Shar-Yin N Huang³, Floris Chabrun¹, Rodolphe Perrot², Arnaud Chevrollier¹, Majida Charif¹, Yves Pommier³, Guy Lenaers¹ and Salim Khiati^{1*}

1 - MitoLab Team, MitoVasc Unit, CNRS UMR6015, INSERM U1083, SFR ICAT, Angers University, Angers, France.

2 - SCIAM, Institut de Biologie en Sante, Université d'Angers, Angers 49933, France.

3 - Laboratory of Molecular Pharmacology, Developmental Therapeutics Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD, USA

(*) Corresponding author: Salim KHIATI.

MitoLab team, Mitochondrial Medicine Research Centre, Unité MitoVasc, Université d'Angers, UMR CNRS 6015, INSERM U1083, CHU Bât IRIS/IBS
Rue des Capucins, 49933 Angers cedex 9, FRANCE.

e-mail: salim.khiati@univ-angers.fr

Tel : 33/0 244 68 84 05

Fax: 33/0 244 68 65 94

Abstract

Mitochondria are essential eukaryotic organelles with their own genome, the mitochondrial DNA (mtDNA) present in hundreds to thousands of copies per cell. Besides mtDNA mutations and rearrangements, mtDNA quantitative changes were reported in many pathological inherited and common conditions, including cancer. If the mtDNA replisome is well known, regulators defining mtDNA amounts are still poorly characterized. To identify new regulators of mtDNA copy number, we measured the mtDNA amounts in the 60 cell lines of the NCI-60 library and screened for genes whose expression is strongly correlated to mtDNA copy number. We identified *CT55* (or *CXorf48*), coding a Cancer/Testis Antigen, as the second highest correlated hit. Experimentally, we found that CT55 protein level in UACC62, SNB-75, HCT116 and SK-MEL2 cell lines parallels mtDNA amounts, and that CT55 silencing decreases mtDNA copy number and delays mtDNA recovery after an acute depletion by ethidium bromide. We found that CT55 is localized to both mitochondria and endoplasmic reticulum due to the presence of an ambiguous N-terminal targeting signal sequence. Finally, we show that CT55 silencing decreases dramatically cell proliferation and that conversely, its expression is associated with poor survival prognosis in patients with tumors expressing wild-type CT55. Together, we show here that CT55 is required at the interface between mitochondria and the endoplasmic reticulum for the maintenance of mtDNA copy number in cancer cells, and that its expression level is associated with cell proliferation and cancer severity.

Introduction

Mitochondria are dynamic organelles producing most of the cellular energy and further involved in many other cellular processes, as the regulation of apoptosis. Mitochondria encompass a 16.5 kb circular genome, the mitochondrial DNA (mtDNA), packed into DNA-protein assemblies called nucleoids. The human mtDNA encodes two ribosomal RNAs and 22 transfer RNAs, essential for the translation of 13 mtDNA-encoded subunits of the respiratory chain complexes. In opposition to the nuclear genome present in two copies per somatic cell, the mtDNA is present in hundreds to thousands of copies per cell, and this amount is tightly regulated according to cell-types and tissues (1). The recent development of next generation sequencing enabled discovering hundreds point mutations and many rearrangements of the mtDNA, which are responsible for mitochondrial diseases with heterogeneous clinical disorders and severities (2). In addition, besides qualitative damages, quantitative changes in mtDNA content also lead to the development of rare genetic devastating diseases, called mitochondrial depletion syndromes (MDS) that manifest usually soon after birth, leading to multi-organ disorders and death during early infancy (3). Further pathological changes in mtDNA copy number have also been reported in common disorders such as diabetic nephropathy (4), post-traumatic stress disorder (5), depression (6) and aging (7), while modifications of mtDNA abundance are often found in cancers and might be a good or bad prognosis factor (8).

Therefore, understanding how mtDNA copy number is physiologically regulated and pathologically dysregulated remains an ongoing challenge (9), although many approaches to identify genes and chemical compounds acting on this regulation have been developed in the recent years. These studies led to the identification of endogenic and exogenic factors acting on mtDNA copy number, including the mitochondrial dNTP pool, the integrity of the replisome (POLG, TFAM, SSBP1 and TWNK), mitochondrial ROS production and the synthesis/degradation rates of mtDNA.

To further address this topic, we developed a strategy using the NCI-60 (National Cancer Institute) database, which is the largest characterized public gene and drug database worldwide (10), to identify novel genes acting on mtDNA copy number. Our approach led to the identification of *CT55* (or *CXorf48*), a gene with almost unknown functions and never related to mitochondrial physiology. *CT55* encodes for two isoforms, long isoform with 264 amino

acids (aa), CT55a, and short isoform with 242 aa, CT55b, lacking the 22 aa residues at the C-terminus. CT55 belongs to the large gene family encoding Cancer/Testis Antigens (CTAs), which are expressed only during spermatogenesis and tumorigenesis (CTDatabase: <http://www.cta.lncc.br/>). In addition, CT55 belongs to a cluster of CTA genes located on the X-chromosome that are co-expressed, and encodes two isoforms with a potential mitochondrial targeting sequence (Aurrière et al., 2020). Here, we show that CT55 is localized in-between the mitochondria and endoplasmic reticulum, and is involved in mtDNA maintenance and cell proliferation in cancer cell lines.

Materials and methods

Cell culture and siRNAs transfection

UACC62 (University of Arizona Cell Culture-62) cells were obtained from NCI-60 (National Cancer Institute) and cultured in standard growth medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM); Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; PAN Biotech), 1mM of sodium pyruvate (Gibco) and 1mM L-glutamine (Dutscher) at 37 °C in presence of 5% CO₂. For CT55 silencing, UACC62 cells were transfected with 5 nM CT55 specific siRNA (siCT55) (SR310386; Origene) or scrambled control (siCtrl), using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications. Silencing efficiency was tested by RTqPCR and Western blot analysis, 72 h after transfection.

Live-cell confocal imaging

UACC62 cells were transfected with plasmids encoding CT55-GFP constructs, and when required with plasmids encoding DsRed-ER and seeded at the density of 5,000 cells/well in four-well glass-bottom μ -slides (80427, Ibidi). After 24h, mitochondria were stained using MitoTracker Red (Molecular Probes) at 50 nM, 15 min before confocal live cell imaging. All images were captured using a Leica TCS SP8 confocal microscope with a 40 \times 1.20 NA water objective lens (Leica Microsystems) equipped with a GaAsP Hybrid detector (HyD), at 37°C. On average, 10 image planes were recorded.

Quantification of mtDNA copy number

For mtDNA quantification, total DNA was isolated from control cells or siRNA treated cells by using a DNeasy Blood and Tissues Kit (Qiagen). qPCRs were performed in triplicate in 96-wells reaction plates (Applied Biosystems). Each reaction (final volume 10 μ l) contained 25 ng DNA, 5 μ l of Power SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 0.5 μ M of each

forward and reverse primer. mitochondrial ND1 gene was amplified together with the nuclear $\beta 2$ microglobulin gene, as a normalizing control. Primer sequences are: ND1-F, 5'-AAGTCACCCTAGCCATCATTCTAC-3' and ND1-R, GCAGGAGTAATCAGAGGTGTTCTT-3'; and $\beta 2m$ -F, 5'-TCCAGCGTACTCCAAAGATTCAGG-3' and $\beta 2m$ -R, 5'-AGTCAACTTCAATGTCGGATGGATG-3'.

Western-blot

Protein lysates were prepared using RIPA buffer supplemented with 1X protease inhibitor cocktail (Roche), subjected to SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes (Amersham Hybond 0.45 μm PVDF). Membranes were blocked for 1h with 5% milk in Tris-Buffered Saline with 0.1% Tween 20 (TBST), then incubated overnight with the following primary antibodies at 1:5000 dilution: mouse polyclonal CT55 (CXorf48) antibody (Abcam, ab69317), alpha Tubulin antibody (Abcam, ab7291). After washing in TBST, membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse-IgG or anti-rabbit-IgG (1:10000 dilution) (GE Healthcare) for 1h and washed with TBST. Bands on immunoblots were detected by using SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (11859290, Pierce).

mtDNA recovery after ethidium bromide-mediated depletion

50 000 UACC62 cells were seeded in 6-well plates. After 24 h, cells were switched to medium with 0.1 $\mu g/ml$ ethidium bromide and grown for 2 days. After 2 rinses with media, cells were incubated in medium without ethidium bromide, and mtDNA was quantified after 2, 3 and 5 days of recovery.

Cell proliferation analysis.

To assess cell viability, we used the IncuCyte S3® system (EssenBioscience), in which the cell density and shape are observed by photonic microscopy, while cells are maintained under standard culture conditions. UACC62 control and siRNA treated cells were seeded in a 6-well plate. Real-time live-cell images were taken every 2 hours. To analyze cell viability, confluence was automatically calculated for 5 days, using the Basic Analyzer segmentation mask of the IncuCyte software 2019B.

Cell viability assays

UACC62 were seeded in 96-well plates and treated with the control and CT55 siRNAs for 1, 3 or 5 days in triplicate, before ATP assessment with the ATPlite 1-step kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Cell viability was analyzed by Crystal Violet staining. After 5 days, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Thermo Fisher Scientific) for 15 min at room temperature. Cells were rinsed twice with PBS and stained with Crystal Violet 0.1% (MilliporeSigma) for 10 min at room temperature, and washed 3 times with distilled water. Then, acetic acid 10% was added and incubated for 20 min under agitation at room temperature. Absorbance was measured using a microplate reader at 590 nm (CLARIOstar®, BMG Labtech)

Results

CT55 mRNA expression level correlates with mtDNA copy number across NCI-60

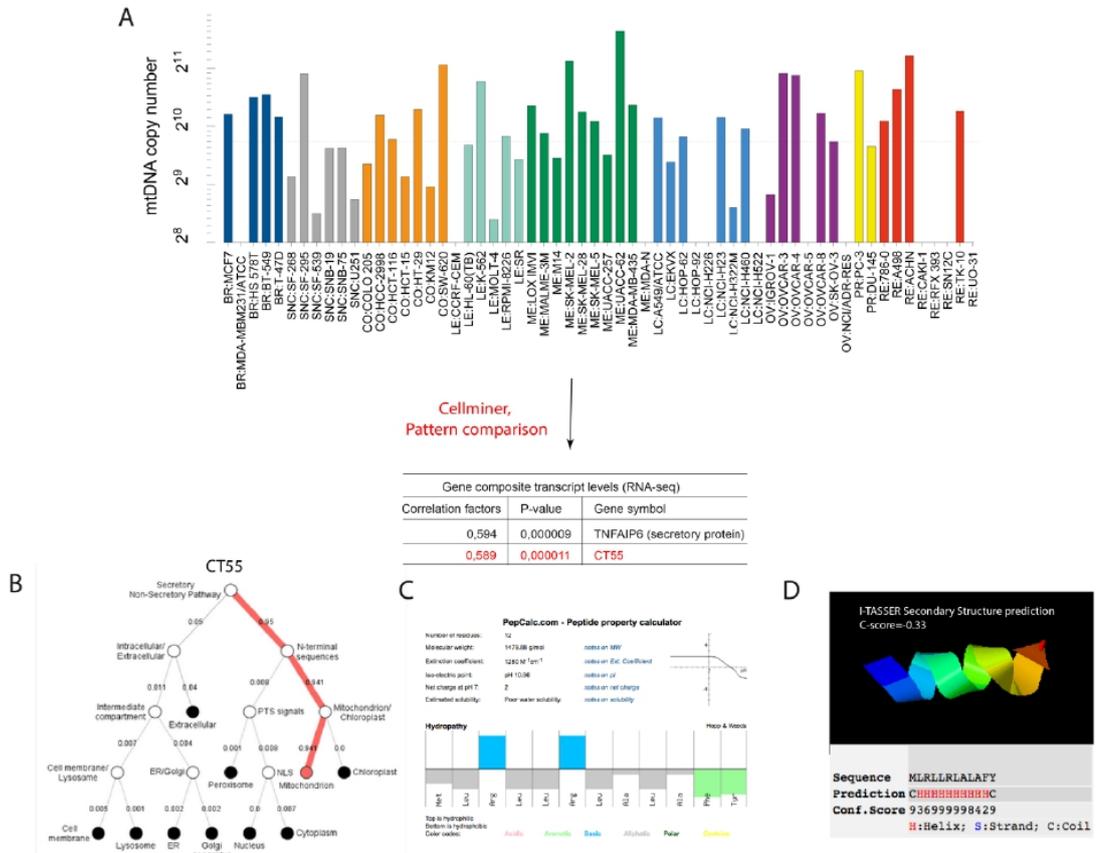


Figure 1: CT55 correlates with mtDNA amount in the NCI-60 database. A) Quantification of mtDNA copy number in the NCI-60 cell lines. CellMiner pattern comparison identified CT55 as the second highest positively correlated gene with mtDNA copy number. B) DeepLoc analysis of the intracellular localization of the CT55 long. C) Analyses of the properties of CT55 N-terminus 12 aa peptide using PepCalc. D) Prediction of the secondary structure of CT55 N-terminus 12 aa, using ITasser (<https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>).

To identify genes whose expression level correlates to mtDNA copy number, we quantified the mtDNA copy number in the NCI-60 cell collection by quantitative PCR, and correlated results to the expression profile of all genes (Figure 1A). Quantification of mtDNA copy number across NCI-60 evidenced large variations of this parameter, ranging from 350 copies to 2500 copies per cell, according to the cell line. Analysis of transcriptomics data evidenced that the second highest positively correlated gene to mtDNA copy number is *CT55*. In particular, we found that the UACC62, SKMEL-2 and LEK-562 cell lines that display a high *CT55* expression level,

contain the highest mtDNA copy number among the 60 cell lines constituting the NCI-60 database (SI-Figure 1).

Analysis of CT55 primary sequence suggested that the protein could be targeted to mitochondria. Indeed, the Deeploc software predicted that CT55 can be localized to mitochondria with very high score of 0.94 (Figure 1B). Similarly, the MitoProt analysis of CT55 primary sequence disclosed a potential N-terminus mitochondrial targeting signal (MTS), consisting of 12 amino-acids positively charged and adopting an α -helix secondary structure (Figure 1C-D). Based on these data, we investigated CT55 functions with a special emphasis on regulating mtDNA copy number.

CT55 controls mitochondrial DNA copy number

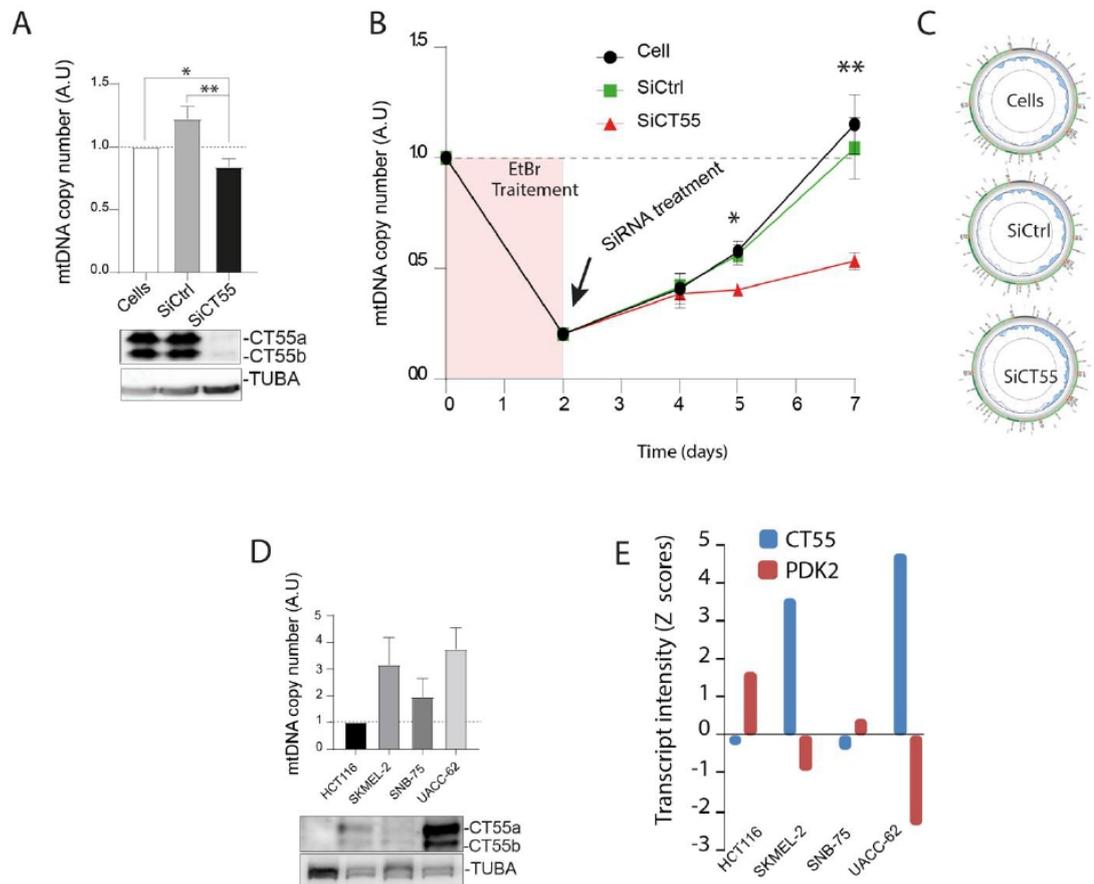


Figure 2: CT55 controls mtDNA copy number. A) Top panel: mtDNA copy number in untreated UACC62 and after treatment with the control (SiCtrl) and CT55 (SiCT55) siRNAs for 5 days. Bottom panel: Western blot showing the expression level of the two CT55 isoforms before and after siRNA treatment (n=6). B) mtDNA depletion and repletion in UACC62 cells. Cells were treated with 200 nM of EtBr for 2 days, then treated with the siRNA in absence of

EtBr. mtDNA copy number was quantified at the indicated days (n=4). C) Circos corresponding to UACC62 mtDNA NGS data, analyzed by the eKLIPse software to analyse mtDNA deletions. D) top panel: mtDNA copy number in HCT116, SKMEL-2, SNB-75 and UACC-62 cell lines; bottom panel: Western blot showing the expression level of CT55 isoforms in these four cell lines (n=4). E) mRNA expression levels of CT55 and PDK2 in the same four cell lines. *PDK2* mRNA expression is the highest negatively correlated gene to CT55 expression level across NCI-60 database. * P<0,05; ** P<0,01. Test Mann-Whitney (A). Test ANOVA (B).

To gain insights in CT55 functions, we selected the UACC62 melanoma cancer cell line, which displays a high CT55 expression level. We first measured mtDNA copy number following CT55 silencing using a specific siRNA (SiCT55), which induced a significant decrease of both CT55 isoforms (Figure 2A, lower panel), paralleling a 30% decrease in mtDNA copy number, compared to cells treated with the control siRNA (SiCtrl) (Figure 2A, top panel). Second, we tested whether cells lacking CT55 were defective in mtDNA synthesis. UACC62 cells were depleted for their mtDNA using ethidium bromide (EtBr), then allowing to recover their mtDNA in normal media. Assessment of mtDNA recovery after EtBr removal showed that the process was significantly slower in CT55 silenced cells, compared to untreated and SiCtrl treated cells (Figure 2B). Indeed, 100 % of mtDNA amount was recovered after five days in control cells, while cells depleted for CT55 displayed only half of the mtDNA quantity after 5 days of recovery, thus suggesting that CT55 interferes with mtDNA replication. We then assessed qualitatively mtDNA integrity by NGS sequencing followed by the processing of data using the eKLIPse tool (11). No rearrangement nor deletion was found in all the set of samples (Figure 2C).

To further substantiate the role of CT55 in mtDNA maintenance, we assessed the relationship between CT55 transcript and protein levels, by measuring CT55 expression by Western blotting in four cell lines: UACC62 and SKMEL2 that highly express CT55, and HCT116 and SNB75 that do not express CT55 (SI-Figure 1). The two bands corresponding to CT55a and CT55b were detected in both UACC62 and SKMEL2 (Figure 2D, bottom panel). In parallel, mtDNA quantification revealed significantly higher mtDNA copy number in UACC62 and SKMEL2, compared to HCT116 and SNB75, thus establishing a correlation between CT55 protein expression level and mtDNA copy number (Figure 2D, top panel).

To gain further insights in CT55 involvement in mitochondrial physiology, we searched across the NCI-60 database, for genes whose expression is correlated to that of *CT55*. Strikingly, the

most negatively correlated gene with *CT55* is *PDK2* (SI-Table 1). Indeed, *PDK2* mRNA is downregulated when *CT55* is upregulated, and vice versa, in the UACC62, SKMEL2, HCT116 and SNB75 cell lines (Figure 2E). This result suggests that *CT55* contributes to stimulate mitochondrial activity, as *PDK2* down-regulates aerobic respiration and inhibits the formation of acetyl-coenzyme A from pyruvate, by phosphorylating PDHA1 and PDHA2, the pyruvate dehydrogenase subunits. Altogether, these data show that *CT55* expression correlates with mtDNA copy number in cancer cells and might be a central modulator of mitochondrial activity.

Dual localization of *CT55* to mitochondria and endoplasmic reticulum

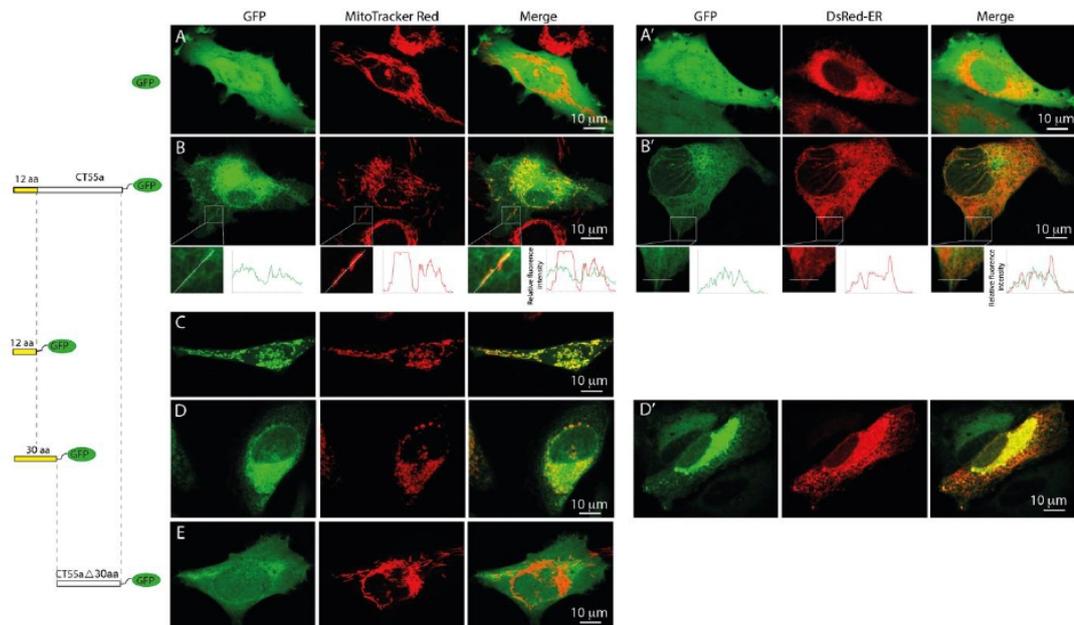


Figure 3: *CT55* colocalizes to mitochondria and ER. Fluorescence microscopy images of UACC62 cells transfected with the indicated *CT55a* constructs (as represented at left of each panel) tagged at C-terminal end with a GFP. A, B, C, D and E) Columns from left to right show GFP (green), MitoTracker Red for mitochondrial staining (red), and merged images. A', B' and D') Columns from left to right show GFP (green), DsRed-ER for ER staining (red) and merged images. B and B') Enlarged views of the boxed areas show the colocalization of the green and red staining. Lines drawn in the enlarged views show the relative fluorescence intensity of the red and green staining.

To confirm the predicted mitochondrial localization of *CT55*, we investigated the role of the 12aa N-terminus sequence in the cellular localization of *CT55*. We generated a series of GFP-

tagged protein constructs and assed their localization by life cell fluorescence confocal microscopy. Our images show that while the GFP alone presents a diffused localization throughout the cell (Figure 3A and A'), CT55a predominantly colocalizes to the DsRed-ER fluorescence in the endoplasmic reticulum (ER) and partially with the MitoTracker fluorescence to mitochondria (Figure 3B and B' and enlarged views). However, the predicted MTS sequence consisting of the N-terminus 12 aa of CT55, localizes exclusively to the mitochondria (Figure 3C). This suggests that an additional localization signal may be present elsewhere in CT55a sequence, leading to its dual-localization to both organelles. In this respect, hydrophobicity analysis of CT55 primary sequence revealed two distinguished domains at the N-terminus: the 12 aa MTS followed by a very hydrophilic domain, from amino-acid 15 to 30 (SI-Figure 2A). Therefore, we investigated the localization driven by the first 30 aa N-terminus sequence and found that it targets the GFP in both the ER and mitochondria, indicating that the 15 to 30 N-terminus hydrophilic sequence is required for ER localization (Figure 3D, SI-Figure 2B). Finally, CT55 deleted for the first 30 aa (CT55 Δ 30aa), localizes uniformly in the cell as the GFP alone (Figure 3E). These results indicate that CT55 harbors a N-terminal "ambiguous" targeting signal leading to its dual localization to ER and mitochondria.

CT55 is required for cell proliferation

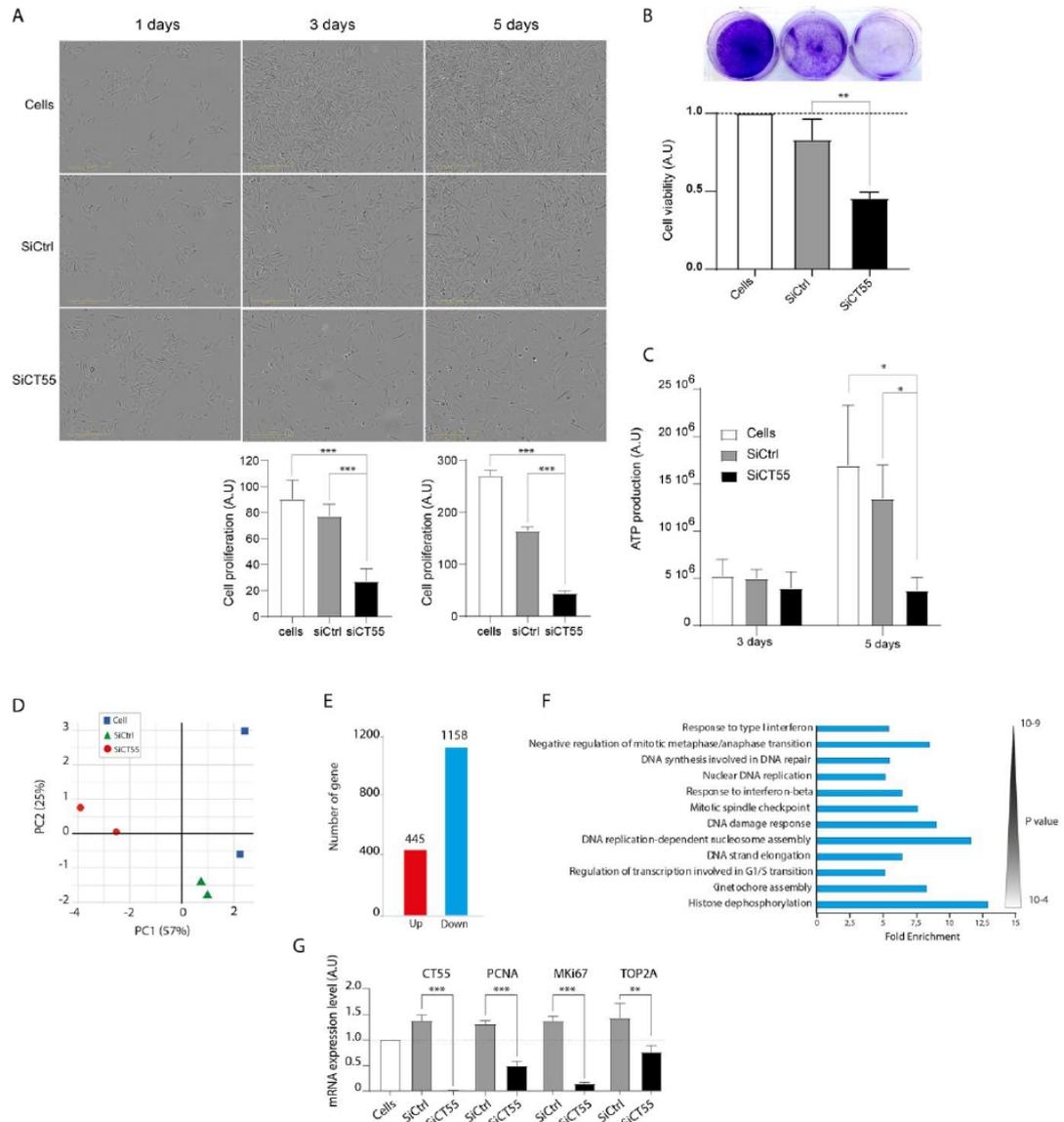


Figure 4: CT55 sustains cell proliferation: A) Upper panels: representative real time images, of UACC62 control cells (top), or treated with the control (middle) and CT55 (bottom) siRNA for 1, 3 and 5 days, Scale barre = 400 μ m. Lower panels show the confluence quantifications. B) Upper panels: representative images of crystal violet staining of control and siRNA treated cells after 5 days; and lower panels show the staining quantification (n=6). C) Measurements of the ATP production using the ATPLite assay (n=3). D) Principal component analysis (PCA) of the RNA-seq data shows one cluster including the UACC62 untreated cells (bleu) and SiCtrl (green) on the right and CT55 silenced cells (red), on the left. E) Total number of genes up (red) or down (blue) regulated with a fold change >2 between control cells (untreated + SiCtrl) and CT55 silenced cells. F) PANTHER gene ontology(12) of enriched pathways including the 1158 downregulated genes. G) RT-qPCR mRNA expression level of PCNA, MKi67 and TOP2A

genes involved in cell proliferation. $M \pm SEM$ (n=3), *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$. Mann-Whitney test.

Because CT55 belongs to the CTA protein family, we investigated whether CT55 function affects cell proliferation. Cell density and shape in the presence or absence of CT55 were assessed using the IncuCyte S3 system in standard culture conditions. Results showed that CT55 silencing drastically reduces cell proliferation after 3 and 5 days (Figure 4A). In parallel, we found that CT55 silenced cells had a 50% increase in cell volume, while their number was decreased by two, compared to controls (SI-Figure 3A). This result was confirmed by crystal violet staining, showing a 50% decreased cell proliferation after 5 days of CT55 silenced cells (Figure 4B). Finally, assessment of ATP amounts, as a marker of cell proliferation, disclosed a drastic reduction after SiCT55 treatment, paralleling the inhibition of cell proliferation (Figure 4C). Further investigation of the β -galactosidase activity excluded the activation of the cellular senescence process (SI-Figure 3B). To gain further insights in the molecular process leading to the inhibition of cell proliferation associated to CT55 silencing, we performed RNA-seq analysis of UACC62 cells treated or not for 3 days with the siRNAs. First, transcriptome analysis confirmed the clear decrease of CT55 mRNA by the SiCT55 treatment, while its expression remained stable in SiCtrl cells (SI-Table 2). Principal component analysis of RNA-seq data revealed a significant first axis ($PC1 = 57\%$) opposing control cells to cells treated with the SiCT55 (Figure 4D). Then, we identified genes that are up- and down-regulated after CT55 silencing and evidenced 445 and 1158 genes up and down-regulated, respectively (Figure 4E). Interestingly, gene ontology analysis of the 1158 downregulated genes, revealed their belonging mainly to cell cycle progression, chromosome organization and cell division (Figure 4F). These results were confirmed by RT-qPCR mRNA quantification of PCNA, MKi67 and TOP2A, three genes involved in cell proliferation (Figure 4G). All together, these results disclose that CT55 is required to support cell proliferation in UACC62 cells.

CT55 is co-expressed with other CTAs, and is associated with poor survival prognosis

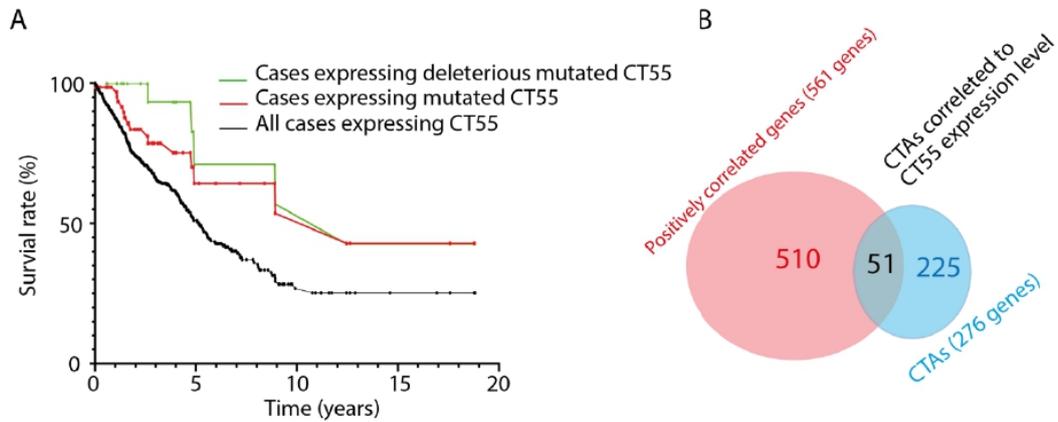


Figure 5: CT55 expression is linked to the poor prognosis of patients with cancer. A) NCI Genomic Data Commons (GDC) analysis showing the survival data of cases with tumors expressing CT55 (631 cases, black line), cases expressing mutated CT55 based on Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) (13) impact (68 cases, red line) and cases expressing deleterious mutated CT55 based on a deleterious Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) (14) impact (25 cases, green line). B) Co-expression of CT55 with other CTAs. Among the 561 positively correlated genes with CT55 in NCI-60 cell lines, 51 belong to the CTA database.

As CT55 is associated to cell proliferation in the UACC62 cancer cell line, we investigated the links between CT55 expression and patient prognosis, in the NCI Genomic Data Commons (GDC) database (15). We found that patients with tumors expressing wild-type CT55 were associated to poorer survival compared to patients with tumors expressing mutated CT55. This result was further enhanced when comparing to patients with tumors expressing CT55 with deleterious mutations (Figure 5A). Finally, as the poor prognosis of patient with positive CT55 head and neck squamous cell carcinoma was reported to be associated to the co-expression of other CTAs (16), we searched among the 561 genes that are correlated with CT55 mRNA expression level in NCI-60, those belonging to the CTA family. We found that among these 561 genes, 51 belong to the CTA family, (CTDatabase, <http://www.cta.lncc.br/>), including 10 from the MAGEA family, MAGEA1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 and 12 (Figure 5B). Taken together, these results show that CT55 is co-expressed with other CTAs and that its expression in cancer tissues is associated with poor prognosis in patients.

Discussion

In order to identify new regulators of mtDNA copy number, we have evaluated the mtDNA copy number in the 60 cell lines from the NCI-60 library, for which extensive data are available, including their transcriptome. By correlating the mtDNA levels to the 22,000 mRNA levels, we identified *CT55* as the second most positively correlated gene, while genes encoding the mtDNA replisome (17) TFAM, POLG, SSBP1 and TWNK or genes involved in mitochondrial biogenesis (18) as PGC-1 α , NRF1 and NRF2 were not identified among the 150 mRNA positively correlated genes to mtDNA copy number. This suggests that in cancer cell lines, regulation of mtDNA amounts might depend on unexpected unknown mechanisms. In this respect, *CT55* belongs to the *CTA* gene family, which has a highly peculiar expression pattern as it is restricted to gametogenesis and cancer cells.

To validate the *in silico* data, we analyzed CT55 protein abundance together with the mtDNA level in 4 cancer cell lines, and confirmed a correlation between both parameters. Similarly, *CT55* silencing was associated to mtDNA decrease. Importantly, in cells firstly depleted on their mtDNA and then on CT55, the mtDNA recovery was defective, suggesting that CT55 controls mtDNA replication. Thus, these results position CT55 as a new regulator of mtDNA replication, at least in cancer cells.

To gain insight into the CT55 functions in mitochondrial physiology, we first examined its cell localization by analyzing its primary protein sequence, and disclosed that it includes a predicted mitochondrial targeting sequence at its N-terminus (19). Surprisingly, the CT55-GFP fusion protein localizes to mitochondria and the ER, due to an ambiguous peptide sequence corresponding to the first 30 aa, with the first 12 aa involved in mitochondrial targeting and the next 15 aa involved in ER localization. This dual localization, already characterized for other proteins (20, 21), is consistent with a possible involvement in the ER-Mitochondrial-Associated Membranes (MAMs), structures that are involved in coupling mtDNA replication to mitochondrial network fission (22). As no change of the mitochondrial network structure was evidenced after CT55 silencing, we can conclude that CT55 function targets the mtDNA replication process independently of the regulation of mitochondrial fission and fusion balance. Thus, the identification of CT55 partners should contribute to better understand how CT55 links MAMs to the control of mitochondrial genome maintenance.

In addition, we found that CT55 silencing drastically reduce cell proliferation, a process paralleling with a significant transcriptional reduction of many genes involved in cell cycle and nuclear DNA replication, as PCNA, MKi67 and TOP2A. These results strongly suggest that in cancer cells, CT55 couples mtDNA replication to a signaling process that regulates the hundreds of genes required for cell proliferation. Yet the precise molecular mechanism remains to be elucidated but warranted for cancer therapy to reduce cell proliferation.

Together, these data questions the specific role of CT55 during spermatogenesis, as a physiological contributor, and during tumorigenesis, as a pathological contributor. It is well known that in both processes, drastic variations of mtDNA copy number are observed. On one hand, during spermatogenesis mtDNA replication must first follow the high rate of cell proliferation, then during the spermatozoon maturation process, mtDNA level must decrease from a hundred copies to few copies to prevent paternal mtDNA transmission (23, 24) and to promote fertility (25). Thus, we can expect that *CT55* expression is high during the early proliferation phases of spermatogenesis, and then switched off during the following maturation process, to decrease mtDNA amount. On the other hand, in cancer cells, drastic quantitative changes in mtDNA copy number were observed, sometimes towards significant mtDNA reduction in bladder and breast cancers (8), kidney and hepatocellular carcinoma (26) and myeloproliferative neoplasm (27), or towards mtDNA proliferation in chronic lymphocytic leukemia, lung squamous cell carcinoma and pancreatic adenocarcinoma (27). These observations highlight that mtDNA content is highly regulated according to the cancer type, which is also observed in mtDNA copy number across NCI-60. Thus, CT55 might be a major contributor in this complex yet unexplained process.

Finally, we observed that CT55 is co-expressed with 51 other CTAs, among which 14 belonging to the MAGE family. Importantly, it is well known that CTA co-expression are correlated to cancers with poor prognosis, because they promote together resistance to chemotherapeutic drugs, inhibition of apoptosis and ultimately cell proliferation (28). For instance, multiple myeloma patients expressing more than 6 CTAs have a much poorer prognosis than those expressing less than 6 CTAs (29).

Thus, the co-expression of CT55 with numerous CTAs must be associated to reduced poor prognosis, a prediction that we confirmed by evidencing that patients with tumors expressing mutated CT55 survive longer than patients expressing wild-type CT55. Therefore, CT55

expression could be a relevant biomarker of aggressive cancers. Altogether, we disclosed here that CT55, as a CTA immunogenic protein, should be a valid therapeutic target for cancer immunotherapy, due to its preeminent involvement in mtDNA maintenance and cell proliferation.

References

1. Copeland, W. C. (2012) Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **47**, 64–74
2. Carroll, C. J., Brilhante, V., and Suomalainen, A. (2014) Next-generation sequencing for mitochondrial disorders. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 1837–1853
3. Suomalainen, A., and Isohanni, P. (2010) Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms. *Neuromuscul. Disord. NMD.* **20**, 429–437
4. Al-Kafaji, G., Aljadaan, A., Kamal, A., and Bakhiet, M. (2018) Peripheral blood mitochondrial DNA copy number as a novel potential biomarker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes patients. *Exp. Ther. Med.* **16**, 1483–1492
5. Bersani, F. S., Morley, C., Lindqvist, D., Epel, E. S., Picard, M., Yehuda, R., Flory, J., Bierer, L. M., Makotkine, I., Abu-Amara, D., Coy, M., Reus, V. I., Lin, J., Blackburn, E. H., Marmar, C., Wolkowitz, O. M., and Mellon, S. H. (2016) Mitochondrial DNA copy number is reduced in male combat veterans with PTSD. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **64**, 10–17
6. Wang, D., Li, Z., Liu, W., Zhou, J., Ma, X., Tang, J., and Chen, X. (2018) Differential mitochondrial DNA copy number in three mood states of bipolar disorder. *BMC Psychiatry.* **18**, 149
7. Foote, K., Reinhold, J., Yu, E. P. K., Figg, N. L., Finigan, A., Murphy, M. P., and Bennett, M. R. (2018) Restoring mitochondrial DNA copy number preserves mitochondrial function and delays vascular aging in mice. *Aging Cell.* **17**, e12773
8. Castellani, C. A., Longchamps, R. J., Sun, J., Guallar, E., and Arking, D. E. (2020) Thinking outside the nucleus: Mitochondrial DNA copy number in health and disease. *Mitochondrion.* **53**, 214–223
9. Moraes, C. T. (2001) What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells? *Trends Genet. TIG.* **17**, 199–205
10. Grever, M. R., Schepartz, S. A., and Chabner, B. A. (1992) The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program. *Semin. Oncol.* **19**, 622–638
11. Goudenège, D., Bris, C., Hoffmann, V., Desquiret-Dumas, V., Jardel, C., Rucheton, B., Bannwarth, S., Paquis-Flucklinger, V., Lebre, A. S., Colin, E., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Reynier, P., Lenaers, G., and Procaccio, V. (2019) eKLIPse: a sensitive tool for the detection and quantification of mitochondrial DNA deletions from next-generation sequencing data. *Genet. Med.* **21**, 1407–1416
12. The Gene Ontology Consortium (2019) The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* **47**, D330–D338
13. McLaren, W., Gil, L., Hunt, S. E., Riat, H. S., Ritchie, G. R. S., Thormann, A., Flicek, P., and Cunningham, F. (2016) The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* **17**, 122
14. Ng, P. C. (2003) SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3812–3814
15. Grossman, R. L., Heath, A. P., Ferretti, V., Varmus, H. E., Lowy, D. R., Kibbe, W. A., and Staudt, L. M. (2016) Toward a Shared Vision for Cancer Genomic Data. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1109–1112
16. Zamuner, F. T., Karia, B. T. R., de Oliveira, C. Z., Santos, C. R. d., Carvalho, A. L., and Vettore, A. L. (2015) A Comprehensive Expression Analysis of Cancer Testis Antigens in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals MAGEA3/6 as a Marker for Recurrence. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 828–834
17. Korhonen, J. A., Pham, X. H., Pellegrini, M., and Falkenberg, M. (2004) Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *EMBO J.* **23**, 2423–2429
18. Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., and Spiegelman, B. M. (1999) Mechanisms Controlling

Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell*. **98**, 115–124

19. Aurrière, J., Goudenège, D., Baris, O. R., Boguenet, M., May-Panloup, P., Lenaers, G., and Khiati, S. (2021) Cancer/Testis Antigens into mitochondria: a hub between spermatogenesis, tumorigenesis and mitochondrial physiology adaptation. *Mitochondrion*. **56**, 73–81
20. Yogev, O., and Pines, O. (2011) Dual targeting of mitochondrial proteins: Mechanism, regulation and function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808**, 1012–1020
21. Bodył, A., and Mackiewicz, P. (2007) Analysis of the targeting sequences of an iron-containing superoxide dismutase (SOD) of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* suggests function in multiple cellular compartments. *Arch. Microbiol.* **187**, 281–296
22. Lewis, S. C., Uchiyama, L. F., and Nunnari, J. (2016) ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science*. **353**, aaf5549
23. Rantanen, A., and Larsson, N. G. (2000) Regulation of mitochondrial DNA copy number during spermatogenesis. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **15 Suppl 2**, 86–91
24. DeLuca, S. Z., and O'Farrell, P. H. (2012) Barriers to Male Transmission of Mitochondrial DNA in Sperm Development. *Dev. Cell*. **22**, 660–668
25. May-Panloup, P., Chrétien, M.-F., Savagner, F., Vasseur, C., Jean, M., Malthiery, Y., and Reynier, P. (2003) Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **18**, 550–556
26. Reznik, E., Miller, M. L., Şenbabaoğlu, Y., Riaz, N., Sarungbam, J., Tickoo, S. K., Al-Ahmadie, H. A., Lee, W., Seshan, V. E., Hakimi, A. A., and Sander, C. (2016) Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *eLife*. **5**, e10769
27. PCAWG Consortium, Yuan, Y., Ju, Y. S., Kim, Y., Li, J., Wang, Y., Yoon, C. J., Yang, Y., Martincorena, I., Creighton, C. J., Weinstein, J. N., Xu, Y., Han, L., Kim, H.-L., Nakagawa, H., Park, K., Campbell, P. J., and Liang, H. (2020) Comprehensive molecular characterization of mitochondrial genomes in human cancers. *Nat. Genet.* **52**, 342–352
28. Fratta, E., Coral, S., Covre, A., Parisi, G., Colizzi, F., Danielli, R., Nicolay, H. J. M., Sigalotti, L., and Maio, M. (2011) The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol. Oncol.* **5**, 164–182
29. Andrade, V. C. C., Vettore, A. L., Felix, R. S., Almeida, M. S. S., de Carvalho, F., de Oliveira, J. S. R., Chauffaille, M. de L. L. F., Andriolo, A., Caballero, O. L., Zago, M. A., and Colleoni, G. W. B. (2008) Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun. J. Acad. Cancer Immunol.* [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2935785/> (Accessed January 3, 2018)

Supporting information (SI) :

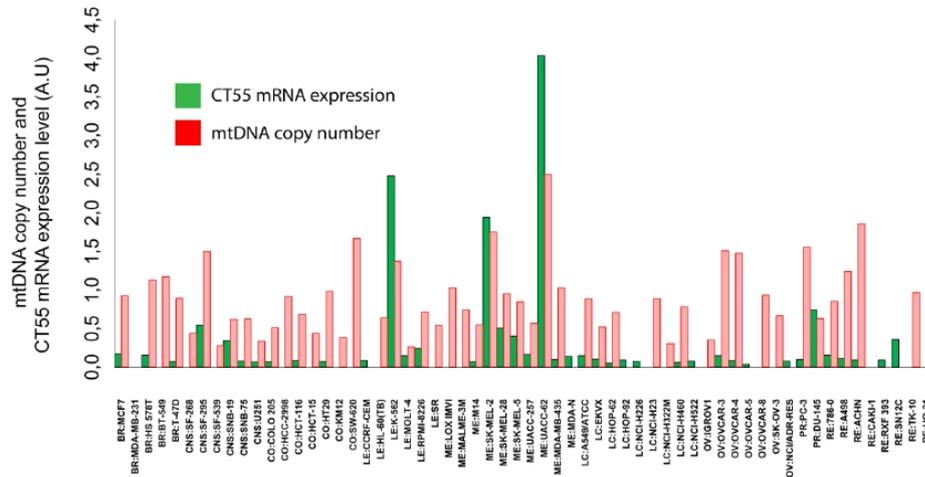


Figure 1: CT55 mRNA expression and mtDNA copy number across NCI60 cell lines.

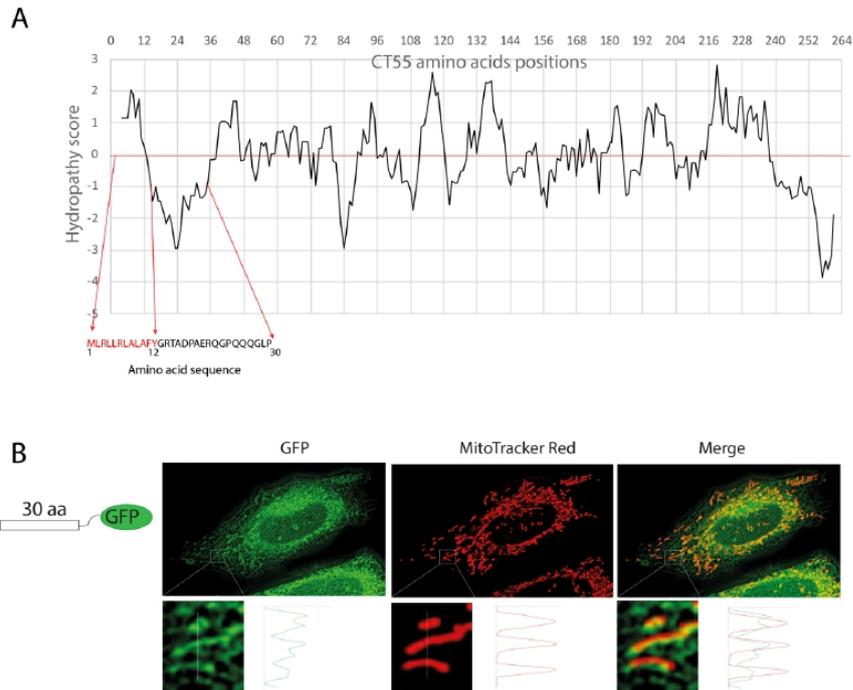


Figure 2: CT55 predicted to harbor an "ambiguous" targeting signal. A) analysis of hydrophobicity of the whole CT55 protein sequence. The sequence of the 30 N-terminus amino acid sequence of CT55 is shown. B) Confocal fluorescence images of the 30 N-terminus amino acid tagged with GFP.

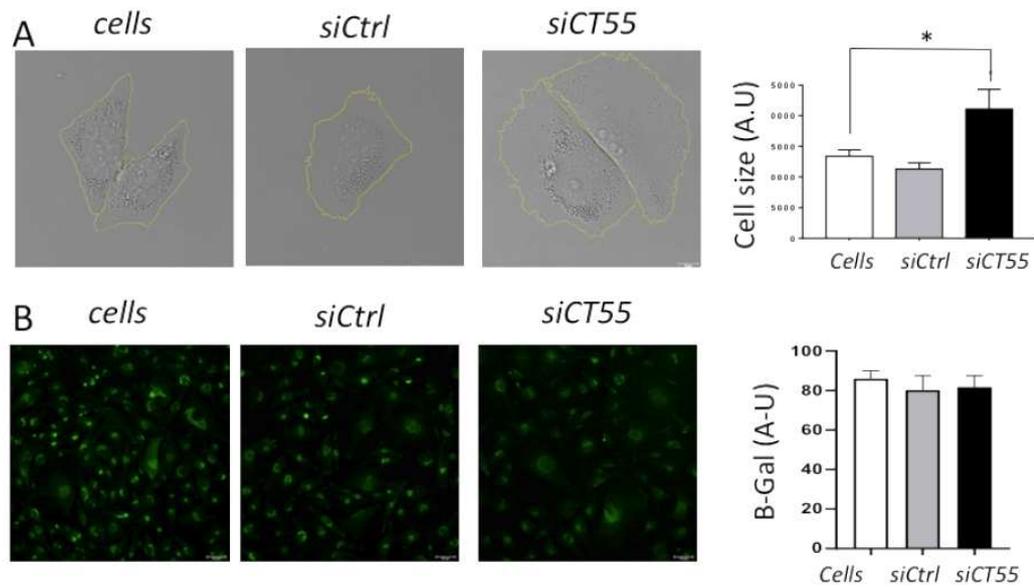


Figure 3: CT55 deficiency increases cell size. A) Phase-contrast microscopy images showing the increase of cell size after siCT55 treatment. B) Fluorescence microscopy images of β -Galactosidase activity showing the absence of senescence in CT55 silenced cells. $M \pm SEM$ (n=3). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Test Mann-Whitney.

Table 1: Genes negatively correlated with CT55 mRNA expression level in NCI-60

Gene composite transcript levels (RNA-seq)		
Correlations factors	P-value	Gene symbol
-0,335	0,00895	SPINT2
-0,336	0,008627	EPS8L2
-0,338	0,008286	TUBA4A
-0,339	0,008022	ECHDC2
-0,339	0,007963	S100A10
-0,341	0,007673	SQRDL
-0,342	0,007462	F8A1
-0,343	0,007267	CABLES2
-0,343	0,007298	LRRC37BP1
-0,346	0,006708	KIAA1147
-0,355	0,005447	NAAA
-0,358	0,004928	SLC16A3
-0,368	0,003826	OCIAD2
-0,368	0,003779	SETD7
-0,374	0,003231	SDC1
-0,386	0,002334	P4HTM
-0,407	0,001242	SH2D4A
-0,41	0,001144	H1FO
-0,444	0,000379	PDK2

Table 2: Transcriptome analysis of CT55 expression level

	Cell	Cell	SiCtrl	SiCtrl	SiCT55	SiCT55
CT55	1688	2659	1717	1423	32	54

1.2. Résultats et discussion

1.2.1. CT55 présente une localisation ambiguë à la mitochondrie et au réticulum endoplasmique

Les données présentées dans ce manuscrit confirment que CT55 présente une MTS, à l'instar des 143 transcrits identifiés dans notre publication de revue. Expérimentalement, nous avons montré que dans des cellules de mélanome, CT55 est localisé au réticulum endoplasmique et à la mitochondrie ; ceci va dans le sens de l'analyse bioinformatique de la séquence protéique et l'immunofluorescence qui a identifié une MTS correspondant aux 12 premiers aa, ainsi qu'un signal peptide des aa 15 à 30 adressant la protéine au RE. Récemment, une étude a identifié un marquage cytoplasmique de CT55 dans des myélomes multiples, mais sans préciser le compartiment cellulaire (Matsushita et al., 2020). La double-localisation de CT55 soulève plusieurs questions : à savoir comment a lieu la modulation du double signal d'adressage ? Est-ce qu'il existe une régulation particulière, comme une phosphorylation, permettant d'inhiber l'un des signaux et ainsi orienter la protéine dans l'un ou l'autre des compartiments à l'image de CYP2B1 (Avadhani et al., 2011a)? Est-ce que des interactions avec ses partenaires médient sa localisation comme pour la protéine LpSOD (Bodył and Mackiewicz, 2007b)? Enfin, existe-t-il un clivage du MTS permettant de rendre accessible le second signal ?

1.2.2. L'expression de CT55 est positivement corrélée avec le nombre de copies d'ADNmt

La corrélation observée *in silico* entre l'expression de CT55 et le nombre de copies d'ADNmt déterminée grâce à la base de données NCI-60, a également été confirmée. En effet, le nombre de copies d'ADNmt est plus important dans les lignées cellulaires avec une forte expression de CT55 (UACC62 et SK-MEL2), que dans les lignées cellulaires n'exprimant que très peu CT55 (SNB-75 et HCT-116). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que CT55 module la réplication de l'ADNmt, tel qu'identifier par le retard de repeuplement de l'ADNmt, après sa déplétion par traitement au bromure d'ethydidium.

En revanche, si la diminution de l'expression de CT55 affecte la quantité d'ADNmt, la qualité ne semble pas altérée, puisqu'aucun réarrangement ni délétion n'a été observé en absence de CT55. Par ailleurs, aucune modification de la structure du réseau n'a pu être mise en évidence, malgré le fait que la surface des cellules est plus importante après inhibition de l'expression de CT55 (Fig.18). Enfin, l'étude par microscopie électronique confirme que la morphologie et la taille des mitochondries ne sont également pas modifiées par le silencing de CT55 (Fig.19).

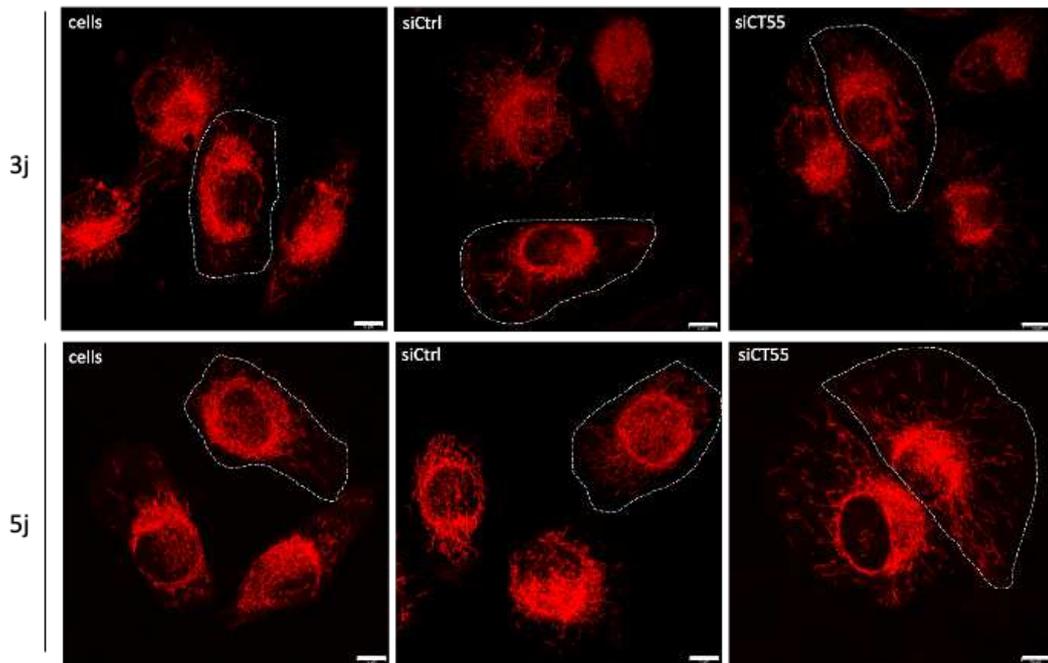


Figure 18: Le réseau mitochondrial n'est pas modifié par l'inhibition de l'expression de CT55. Après 3j et 5j de traitement au siRNA, le marquage au Mitotracker ne permet de visualiser de modification de structure du réseau mitochondrial. La périphérie d'une cellule par image est indiquée en pointillés, déterminée par observation en contraste de phase (Barre d'échelle = 10µm)

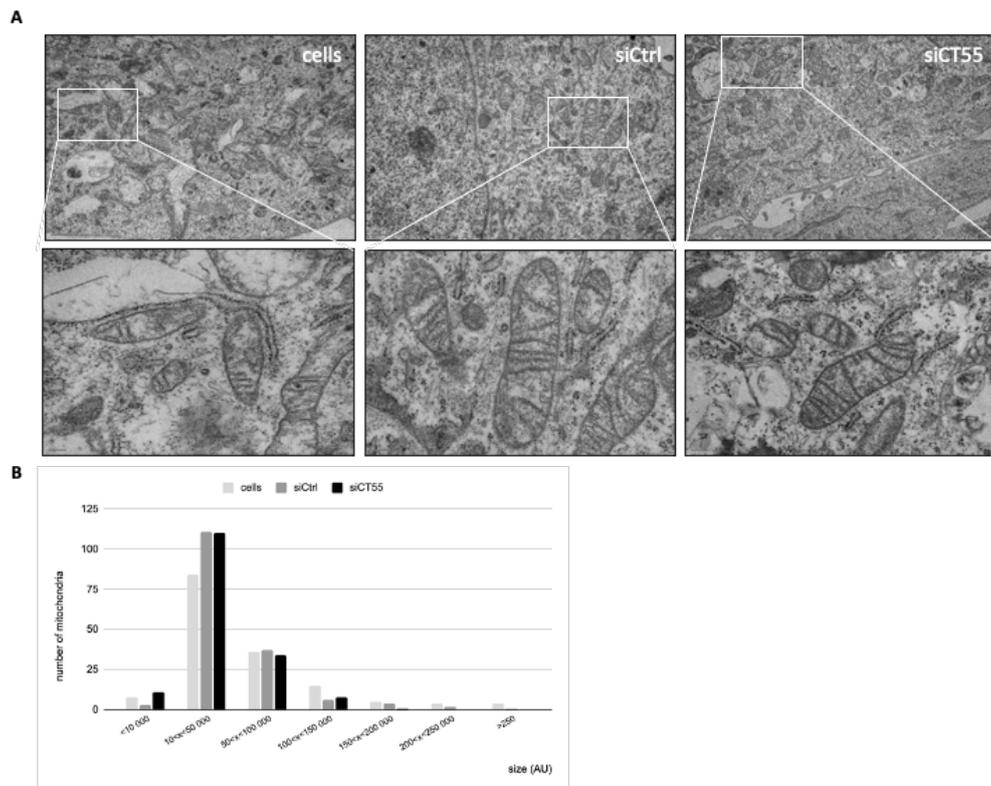


Figure 19: La morphologie et la taille des mitochondries ne sont pas modifiées par une diminution de l'expression de CT55. A. Images de microscopie électronique de cellules traitées ou non pendant 3j par les différents siRNA. B. Quantification de la taille des mitochondries dans les cellules non traitées (cells), siCtrl et siCT55.

1.2.3. Une diminution de CT55 est associée à une inhibition de la prolifération

Enfin, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de CT55 induit une diminution drastique de la prolifération des cellules UACC62, ce qui suggère que CT55 est un élément clé de la prolifération de ce modèle cellulaire. Il serait de fait intéressant de savoir si CT55 est un élément régulateur de la prolifération, et dans ce cas son taux d'expression serait proportionnel à la vitesse de prolifération, ou si CT55 est un élément essentiel, à la prolifération de cellules cancéreuses, mais alors pourquoi ne le serait-elle pas pour la prolifération de cellules somatiques ? De plus, nous montrons que l'expression de CT55 est corrélée à celle de 51 autres CTAs ainsi qu'à un mauvais pronostic. En effet, plus nombreux sont les CTAs co-exprimés ensemble, plus le stade de cancer est avancé et plus la survie des patients est réduite. Une étude sur les myélomes multiples a permis de déterminer qu'au-delà d'un seuil d'expression de 6 CTA, les patients présentaient une courbe de survie drastiquement diminuée (Andrade et al., 2008), illustrant l'effet délétère de la co-expression des CTA sur la progression des cancers. Ceci se confirme par le fait que les patients avec un cancer exprimant la protéine CT55 sauvage ont une diminution de leur survie plus importante que ceux exprimant CT55 muté. Donc, l'expression de CT55 est un facteur de mauvais pronostic pour les patients.

1.3. Conclusion et perspectives

Nos résultats montrent pour la première fois une localisation de CT55 à la mitochondrie et au réticulum endoplasmique grâce à un signal ambigu en position N-terminale. De fait se pose la question de savoir si CT55 exerce une fonction dans les deux compartiments, s'il fait la navette entre eux ou encore, s'il est localisé à l'interface, dans des zones de jonction : les Mitochondrial Associated Membranes. Pour répondre à cette question, il faudrait vérifier par un fractionnement cellulaire si CT55 est présent dans les MAMs. La microscopie électronique couplée à l'immunogold permettrait également de répondre plus précisément à la question de la localisation de CT55.

Afin poursuivre l'étude de la fonction oncogénique de CT55, il faudrait observer *in vitro* les capacités de migration et d'invasion des cellules cancéreuses avec ou sans expression de CT55, par exemple en réalisant des tests de blessure et en utilisant une chambre de Boyden. *In animo*, l'injection de cellules exprimant ou non CT55 dans des souris permettraient d'évaluer si des tumeurs peuvent se développer en absence de CT55 et dans ce cas, si elles présentent une différence de taille avec les tumeurs issues de cellules contrôle.

Enfin, nous avons établi une corrélation quantitative entre CT55 et l'ADNmt, ce qui pourrait avoir des applications pour le traitement des cancers, étant donné qu'une diminution du nombre de copies d'ADNmt accentue la sensibilité aux agents de chimiothérapie (Mei et al., 2015). Du fait de toutes ces observations, CT55 est donc une cible intéressante pour le traitement des cancers. Reste à savoir quel est son rôle dans le processus de spermatogenèse.

2. Résultats et données complémentaires

Au cours de nos études expérimentales et *in silico*, nous avons obtenus des résultats et informations supplémentaires que nous exposons ci-après.

2.1. Analyse de la séquence protéique de CT55

2.1.1. Domaines identifiés et prédictifs

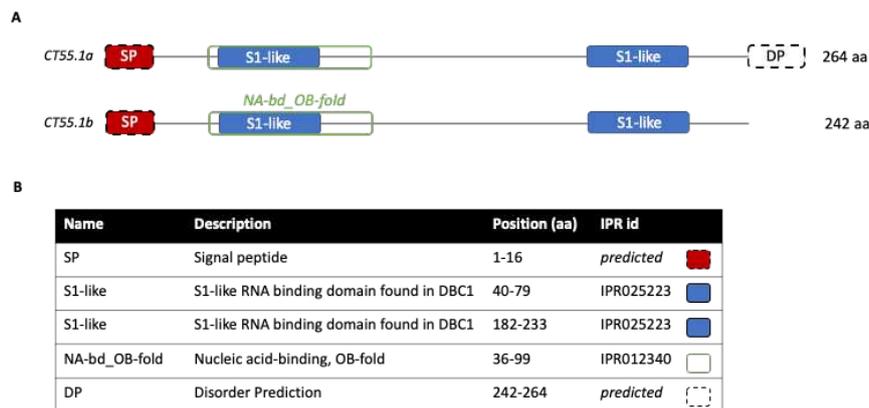


Figure 20: Identification et annotations des domaines de CT55. A. Représentation schématique des domaines des deux isoformes humaines de CT55 (CT55.1a et CT55.1b) avec l'identification des domaines par le logiciel InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>) (Mitchell et al., 2019). B. Tableau indiquant les domaines, leur position au sein de la séquence et l'identifiant InterProScan.

L'analyse des séquences des deux isoformes de CT55 a identifié les domaines suivants (Fig.20):

- Un domaine **SP** peptide signal prédictif localisé en N-terminal de la protéine (1-16aa). Expérimentalement, nous l'avons confondu au signal d'adressage mitochondrial (MTS).
- Deux domaines **S1-like** de liaison à l'ARN, identifiés dans la base de données PFAM. Les protéines qui contiennent ces domaines sont capables d'interagir à la fois avec des microARNs (miARN) et des ARN messagers (ARNm).
- Un domaine **OB** « oligonucleotide/oligosaccharide binding » est une structure caractéristique qui définit la superfamille des protéines de liaison aux acides nucléiques simple brin comme des protéines stabilisant l'ADN simple brin, ou des enzymes qui ajoutent les coiffes de l'ARN (Agrawal and Kishan, 2003; Theobald et al., 2003).
- Un domaine **DP** prédit de région désordonnée présent uniquement dans l'isoforme long de CT55 qui pourrait conférer une fonction différente aux deux isoformes (Romero et al., 2006). Les protéines désordonnées sont des protéines qui *in vitro*, n'ont pas de structure 3D fixe soit sur toute leur longueur soit uniquement pour un domaine. Cette flexibilité est nécessaire à leur fonction pour modifier leur conformation et favoriser des interactions avec leur cible (Babu, 2016). Cette originalité a été retrouvée pour de nombreux CTA dont les X-CTA (Rajagopalan et al., 2011).

2.1.2. Similarité avec l'hélicase MOV10L

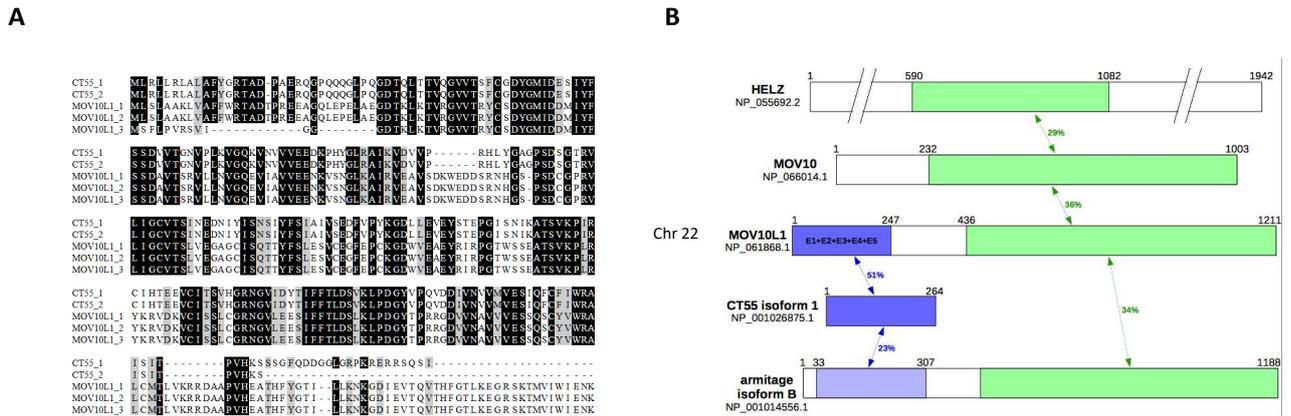


Figure 21: Similarité de séquence entre CT55 et MOV10L. A. Alignement de la séquence protéique des 2 isoformes de CT55 avec le début de la séquence des 3 isoformes de MOV10L (1-280aa). En noir : les résidus conservés, en gris : les résidus similaires, en blanc : les résidus non conservés. B. Représentation schématique du pourcentage d'identité entre les séquences de MOV10L et CT55.

CT55 présente une similarité de 51% avec la région N-terminale de MOV10L1 (Moloney Leukemia virus 10-like 1) une RNA- hélicase dépendante de l'ATP (Fig.21). MOV10L1 est un composant du nuage méiotique, aussi nommé P granule, qui est un organite spécifique des cellules germinales réprimant l'activité des transposons pendant la méiose. Elle est nécessaire pendant la spermatogenèse pour réprimer la mobilité des éléments transposables et maintenir l'intégrité de la lignée germinale. Elle agit par interaction avec des piARN (Piwi-interacting ARN) qui forment des complexes avec la protéine PIWI pour méthyler et réprimer des transposons (Vourekas et al., 2015).

La région C-terminale de MOV10L1 possède elle-même des similarités importantes avec d'autres protéines humaines comme HELZ (Probable Helicase with Zinc finger domain) ou MOV10 (Moloney Leukemia virus 10), et également avec une protéine présente chez la drosophile (*Drosophila Melanogaster*) : armitage.

HELZ est, comme son nom l'indique, une hélicase avec un domaine « zinc finger » qui joue un rôle dans le métabolisme des ARN de l'embryon en développement (Hasgall et al., 2011). MOV10 est une RNA hélicase présente dans le noyau et les granules cytoplasmiques, impliqué dans la dégradation de l'ARNm ciblés par les microARN (miARN) (Fu et al., 2019). Armitage est aussi une RNA hélicase impliquée dans la polarisation de l'oocyte pendant l'ovogenèse chez la drosophile. Elle joue un rôle central dans le processus des ARN interférents qui médie la destruction des ARNm et permet la répression traductionnelle. D'une manière surprenante, elle a été localisée à la mitochondrie (Ge et al., 2019).

2.2. Interactome de CT55 : identification de partenaires du RE, des mitochondries et des vésicules du complexe SNARE

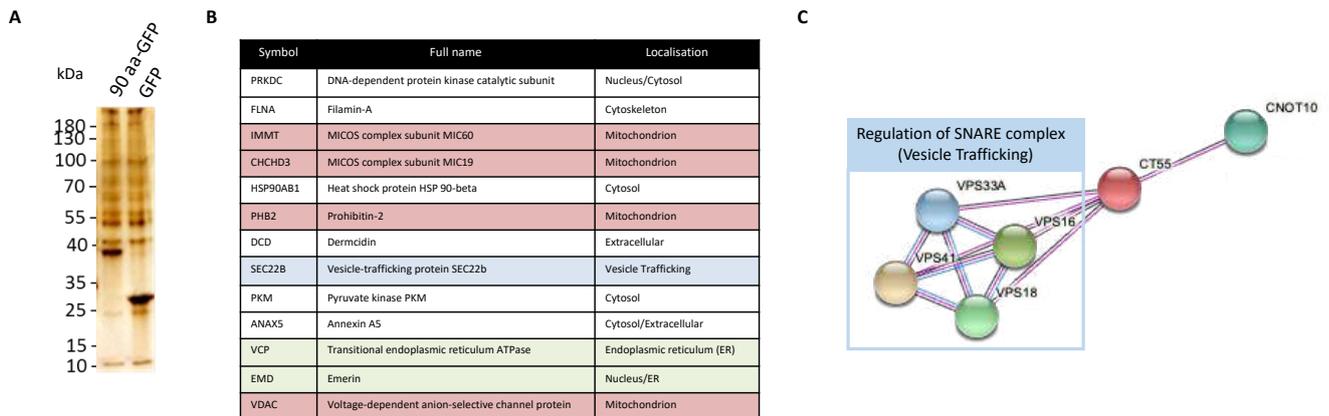


Figure 22 : Interactions de CT55 avec des protéines du RE, de la mitochondrie et des vésicules. A. Immunoprécipitation de la GFP fusionnée avec les 90 premiers acides aminés (aa) N-terminaux de CT55. B. Identification des protéines interagissant avec ces peptides issus de CT55. C. Schéma représentant les partenaires de CT55 identifiés par la base de données STRING Database (<https://string-db.org/>) (Szklarczyk et al., 2019).

Pour identifier les partenaires de CT55, nous avons immunoprécipité (IP) un peptide de 90 acides aminés de CT55 fusionné à la GFP, suivi d'une analyse par spectrométrie de masse (MS) de l'ensemble de l'IP (Fig. 22 A,B). En effet, les anticorps commerciaux dirigés contre CT55 n'étant pas immuno-précipitant, nous avons construit une protéine de fusion CT55-GFP, mais malheureusement la sur-expression de CT55 induit la mort cellulaire. Donc, nous avons cloné les 90 premiers aa en position N-terminale de CT55 tagués avec la GFP, ce peptide intégrant l'un des 2 domaines S1-like. Ce fragment ne présentant pas de toxicité, nous l'avons sur-exprimé et réalisé l'IP avec l'anticorps anti-GFP. L'analyse en spectrométrie de masse a révélé que ce peptide (90aa) interagissait avec des protéines mitochondriales (VDAC, Prohibitins et MICOS : MIC60 et MIC19), des protéines du réticulum endoplasmique (VCP) et des protéines du trafic des vésicules (SEC22b). En lien avec nos résultats précédents, il est notable que VDAC est une protéine des MAM (Vance, 2014a), également décrite pour interagir avec les MICOS à la MMI (van der Laan et al., 2016). Donc, les résultats de cette IP renforcent l'idée que CT55 serait localisée aux jonctions entre le RE et les mitochondries, c'est-à-dire au niveau des MAM (Mitochondria-Associated ER membranes).

Pour appuyer cette hypothèse, nous avons interrogé la base de données colligeant toutes les interactions protéine-protéine connues et prédites : STRING Database (<https://string-db.org/>) (Fig. 22 C). Pour CT55, un cluster composé des quatre protéines : VPS33A, VPS16, VPS18 et VPS41 est proposé. Ces protéines sont impliquées dans le transport vésiculaire et contribuent au complexe HOPS (HOMotypic fusion and vacuole Protein Sorting), régulant la fusion des vacuoles par interaction avec le complexe SNARE (Soluble NSF attachment protein REceptor), notamment pour l'élimination des autophagosomes. Une autre protéine potentiellement en lien avec CT55 est CNOT10 (CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 10), une deadenylase d'ARNm impliquée dans la dégradation des ARNm et la répression de la traduction.

En combinant toutes ces informations obtenues *in vitro* et *in silico*, il apparaît que CT55 agit comme une plateforme à l'interface du RE et de la mitochondrie, et aussi des vésicules, en lien avec la régulation des ARNm ou piRNAs, un monde émergent dont l'essentiel reste à découvrir en termes de fonctions et régulations cellulaires.

2.3. Expression physiologique de CT55

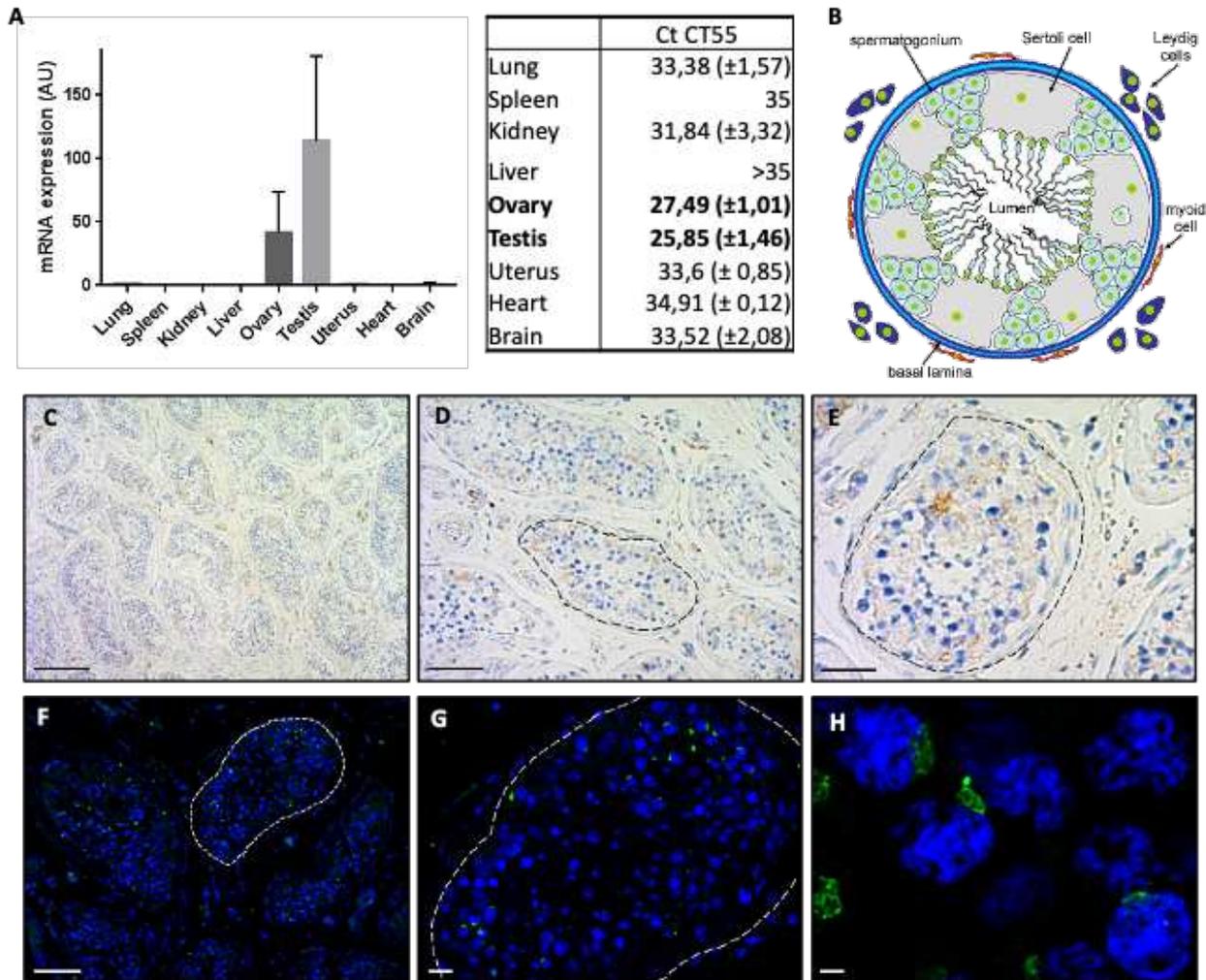


Figure 23 : CT55 est principalement exprimé dans les testicules et ovaires. A. qPCR de CT55 dans des échantillons de 9 tissus de souris : poumon, rate, rein, foie, ovaire, testicule, utérus, cœur et cerveau (n=3). Le tableau indique les seuils de cycle (Cycle Threshold – Ct) observés pour CT55. B. Représentation schématique de l'organisation d'un tubule séminifère et des types cellulaires de la spermatogenèse (Histology Guide © Faculty of Biological Sciences, University of Leeds). C-H. Immunolocalisation de CT55 dans le testicule adulte humain. Les coupes de testicules sont fixées dans du paraformaldéhyde et incubées avec un anticorps anti-CT55. C.D.E Le révélateur utilisé pour CT55 est le DAB (marron), les noyaux (bleu) sont marqués avec l'hématoxyline (barre d'échelle 200 µm (C) ; 40 µm (D) ; 20 µm (E)) D.E.F. Un anticorps secondaire 488 anti-mouse spécifique de l'anticorps anti-CT55 (vert) a été utilisé et les noyaux (bleu) marqués au DAPI. Un signal spécifique à CT55 est présent dans les tubules séminifères (indiqués en pointillés) (barre d'échelle 100 µm (F) ; 20 µm (G) ; 5 µm (H)).

Pour appréhender l'expression physiologique de CT55, nous avons réalisé une PCR quantitative sur des échantillons de différents tissus de souris, qui montre clairement que son expression est restreinte aux testicules et ovaires de souris, et non significatif pour les autres tissus, en accord avec le profil d'expression défini pour les CTA (Fig.23 A).

Pour localiser l'expression de CT55 dans les testicules, nous avons utilisé des coupes paraffinées de testicules humains fixées au paraformaldéhyde, et réalisé un immunomarquage. Dans un premier temps, nous avons observé un signal marqué par le DAB (3,3'-Diaminobenzidine) correspondant à CT55 en périphérie des tubules séminifères, les noyaux étant marqués à l'hématoxyline (Fig.23 B,C,D,E). Dans un second temps, nous avons réalisé une localisation par immunofluorescence avec un anticorps secondaire Alexa-488 et DAPI (Fig.23 F,G,H). Nous retrouvons l'expression de CT55 en périphérie des tubules séminifères, suggérant que CT55 est spécifique des stades précoces de la spermatogenèse.

Enfin, le signal intracellulaire proche du noyau, pourrait correspondre à l'appareil de Golgi, mais des expériences de co-marquages seraient nécessaires pour préciser non seulement le type cellulaire dans lequel CT55 est exprimé, mais encore l'organite du cytoplasme.

2.4. Conclusion et Discussion

2.4.1. Expression et localisation cellulaire de CT55 en physiologie

CT55, en tant que membre de la famille des Cancer/Testis Antigen, se doit de respecter un profil d'expression restreint aux tissus cancéreux et aux testicules. Nos résultats de qPCR effectuée sur les tissus de souris, confirment l'expression principale de CT55 dans les testicules et aussi plus faiblement dans les ovaires. Dans la banque de données CTDatabase (<http://www.cta.lncc.br>), CT55 est classé comme étant « testis-restricted ». En effet, si les CTA ont été d'abord décrits comme spécifique du testicule, certains ont été détectés dans d'autres tissus en situation physiologique. De fait une classification plus précise des CTAs a émergé ces dernières années précisant trois groupes selon leur profil d'expression : 1) restreint aux testicules, 2) restreint aux testicules et au cerveau, ou 3) dans les testicules un ou deux autres tissus. Or, dans une étude portant sur le glioblastome, CT55 a été détecté dans les tissus contrôles de cerveau (Freitas et al., 2013). Etant donné que nous n'avons pas identifié d'expression de CT55 dans le cerveau de souris, mais dans les ovaires, l'expression de CT55 semble donc « testis-selective » et non pas « testis-restrictive », donc préférentielle dans les testicules et aussi dans un ou deux autres tissus.

De plus, l'expression des CTA au cours de la spermatogenèse semble hétérogène. En effet, retrouvée en périphérie du tubule séminifère, l'expression de CT55 pourrait être restreint aux spermatogonies et spermatoocytes localisés en périphérie des tubules, à l'instar d'autres X-CTA, comme NY-ESO-1, exprimés lors des premières étapes de la spermatogenèse (Satie et al., 2002). A l'inverse, les « non X-CTA » seraient plutôt spécifiques des phases tardives de la spermatogénèse comme ACRBP ou post-méiotiques comme SPA17 qui est exprimé dans les spermatoïdes ronds dans la lumière des tubules (Cheng et al., 2011).

Au cours de la spermatogenèse, les mitochondries présentent des variations métaboliques importantes, comme nous l'avons décrit dans notre revue. Ainsi, avant la barrière hémato-testiculaire (BHT), malgré la proximité du sang et d'un environnement riche en dioxygène, les cellules sont hautement glycolytiques. A l'inverse, après cette BHT, l'environnement est plus pauvre en dioxygène mais devient riche en lactate sécrété par les cellules de Sertoli, qui contraint les phases tardives de la spermatogenèse à un retour vers une activité oxydative. Dans ce sens, la morphologie des mitochondries change en fonction de leur activité, passant progressivement d'un stade « orthodoxe » à un stade « condensé » dans les spermatoocytes II et spermatoïdes. De plus, leur distribution subit un réarrangement en fin de spermatogenèse pour former la gaine mitochondriale nécessaire au mouvement du flagelle. En parallèle, tout au long de la spermatogenèse, le nombre de copies d'ADNmt décroît par l'arrêt de la réplication, parallèlement à l'expression des protéines TFAM et POLG. Il semble donc qu'il y existe une corrélation forte entre l'expression de CT55 en début de spermatogenèse et donc avant la BHT, qui disparaîtrait dans les stades tardifs, pour induire une réduction drastique de l'ADNmt dans les spermatozoïdes matures, et ceci associé à un « shift métabolique ».

2.4.2. CT55, impliqué dans la régulation de l'ADNmt via les MAM.

L'immunoprécipitation du peptide issu de CT55 (90aa) a révélé des interactions avec des protéines mitochondriales : VDAC, prohibitin, MIC60 et MIC19 (MICOS), associées aux MAM. Or, la réplication de l'ADNmt est étroitement coordonnée avec la fission mitochondriale au niveau des MAM. En effet, Mic60 lié aux nucléoïdes s'associe aux protéines motrices Miro1 et KIF5B de la MME, suggérant que la dynamique de réplication des nucléoïdes pourrait être affectée en l'absence de CT55 (Qin et al., 2020). Par ailleurs, l'absence de CT55 diminue les réponses inflammatoires dans le cancer du côlon, or le rôle des MAM dans l'inflammation est bien caractérisée. Dans ce sens, nous avons pu montrer grâce à la transcriptomique une diminution d'un gène impliqué dans la voie de réponse à l'interféron : IFI27 (Interferon Inducible 27) dans les cellules siCT55. De plus ces sites sont particulièrement enrichis en miARNs impliqués dans les réponses inflammatoires (Wang et al., 2020a). Ainsi, l'une de nos nous pouvons émettre l'hypothèse que CT55 régule le nombre de copies d'ADNmt, voire aussi la réponse auto-immune, au travers des MAM, en interagissant avec une catégorie d'ARN, probablement des mi ou pi-ARNs. Donc, valider la localisation de CT55 aux MAM est un objectif essentiel, au même titre que l'identification de ses partenaires nucléiques, pour déterminer la fonction de CT55, voire de chacun de ses deux isoformes.

2.4.3. CT55 pourrait être impliqué dans la régulation des piRNA.

L'analyse *in silico* de la séquence protéique de CT55 a montré l'existence de deux domaines de liaison à l'ARN ainsi qu'une similarité importante avec des protéines impliquées dans la régulation des piRNA et notamment avec la région amino-terminale de MOV10L, avec laquelle elle partage plus de 50% d'identité. Après les microARN et les siARN, une troisième classe de petits ARN a été récemment découverte, les piwi-interacting ARN (piARN) (Aravin et al., 2006; Watanabe et al., 2006). Exprimés spécifiquement au niveau des cellules germinales, ils se lient à une protéine de la famille Piwi, pour inhiber la transposition d'éléments mobiles du génome. Les différents acteurs de la machinerie des piARNs sont confinés dans des granules cytoplasmiques, encore appelés nuages. Ce sont des structures denses, dépourvues de membranes mais riches en ARNs et protéines, et localisés en microscopie électronique au niveau de la MME ou en bordure de la membrane nucléaire (Eddy et al., 1975). Chez les mammifères, trois structures différentes rassemblent la plupart des acteurs de la machinerie des piARNs : les ciments intermitochondriaux, les corps P ou processing bodies, et les corps chromatoïdes, qui se différencient selon leur localisation et leurs propriétés biochimiques. Les ciments intermitochondriaux sont des structures localisées entre les mitochondries et participent à la biogenèse des piARN (Muller et al., 2013).

MOV10L a été localisé à la MME et décrit comme un composant principal des ciments intermitochondriaux (Wang et al., 2020b). Chez la souris, MOV10L interagit avec MILI et MIWI (PIWIL2 et PIWIL1 chez l'Homme) (Frost et al., 2010) que nous avons identifiés comme potentiellement des CTA mitochondriaux, ainsi que GPAT2, récemment décrit pour participer à la biogenèse des piARN (Shiromoto et al., 2019). Or un lien fonctionnel existe entre la mitochondrie et le « nuage », par l'intermédiaire de MitoPLD, une autre protéine mitochondriale. Ceci suggère qu'une signalisation issue des mitochondries pourrait réguler l'assemblage et la fonction des composants du « nuage » (Huang et al., 2011; Watanabe et al., 2011), et à l'instar de PIWIL1 et PIWIL2, CT55 pourrait jouer

un rôle dans la biogenèse de ces piARN. Si cette voie est actuellement bien décrite dans la spermatogenèse, peu d'informations concernent son rôle dans les cellules cancéreuses.

Au cours de la spermatogenèse, ces ciments intermitochondriaux permettent de maintenir l'intégrité du génome (Fig.24). Brièvement, les précurseurs des piARN qui sont exportés depuis le noyau, sont pris en charge par les protéines du ciment inter-mitochondrial et notamment MILI pour générer des piARN primaires matures. Liés à MILI, ils entrent ensuite dans un cycle « ping-pong » pour assurer le clivage des transcrits complémentaires. Ils deviennent alors des piARN secondaires en contact avec MILI ou MIWI2. L'association piARN secondaire-MIWI2 est ensuite transloquée au noyau pour induire une méthylation des éléments transposables (Wang et al., 2020b). Or, chez l'Homme, les MAM sont très abondants lors de la spermatogenèse, et contiennent des protéines impliquées dans la voie de biogenèse des piARN comme TDRD6, MAEL, PIWIL1, DDX4 et GPAT2 (Wang et al., 2018). Néanmoins, le rôle de ces MAM dans la régulation de la voie des piARN reste à définir.

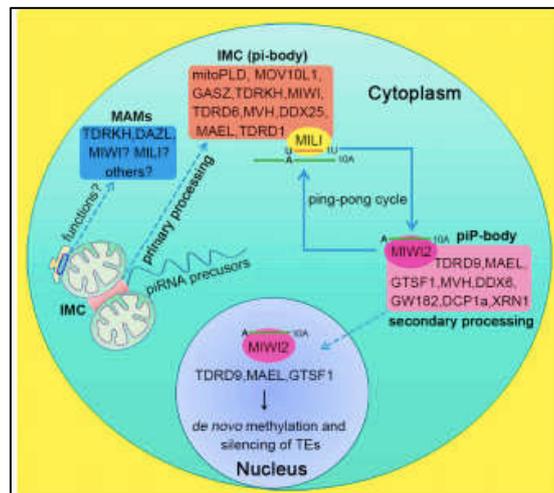


Figure 24: Représentation schématique des structures, des composants et fonctions de biogenèse des piARN dans les cellules germinales. Le ciment intermitochondrial (IMC), nommé également pi-body, avec MILI est responsable du traitement primaire des précurseurs des piARN. Le piP-body, avec MIWI2 est responsable du traitement secondaire des piARN, qui une fois matures pourront inhiber l'expression des éléments transposables. Les MAM incluent des protéines impliquées dans la biogenèse des piARN (Wang et al., 2020b)

Dans le cancer en revanche, cette voie des piARN est bien moins décrite. Le rôle de PIWIL a été suggéré dans la dégradation de l'ARN, la méthylation de l'ADN et la régulation des niveaux de phosphorylation de multiples protéines (Liu et al., 2019). Récemment, PIWIL1 a été identifié dans des structures périnucléaires de cancer colorectal ressemblant aux « nuages » (Sellitto et al., 2019). De plus, MAEL (Maelstrom), un autre CTA impliqué dans la biogenèse de piARN des cellules germinales, interagit avec les granules de stress dans les cancers du sein et colorectal (Yuan et al., 2014). Par ailleurs, la localisation des protéines PIWI dans des mitochondries de cellules cancéreuses de mammifères a été proposée, et l'alignement de la séquence de 29 piARN avec l'ADNmt humain a suggéré une implication de ces piARN dans la fonction mitochondriale et la résistance à l'apoptose (Kwon et al., 2014). Donc, le rôle de la voie des piARN en conditions pathologiques reste à définir, mais définit clairement une fonction spécifique intimement connectée à l'expression de certains CTA dont CT55.

Conclusion générale

Mes travaux de thèse auront permis d'identifier CT55 comme un nouveau régulateur du nombre de copies de l'ADNmt et de la prolifération cellulaire, spécifiquement dans les cellules tumorales. Bien que les mécanismes moléculaires associés à CT55 ne soient pas encore clairement identifiés, il apparaît que ceux-ci se localisent probablement dans les MAM et impliquent des régulations du métabolisme de petits ARN, dont l'identité, la fonction et l'interaction avec CT55 restent à démontrer. Remarquablement, le profil d'expression de CT55, à l'image des autres CTAs, suggère que l'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus cellulaires sont spécifiques des cellules cancéreuses et des lignées germinales, mais qu'ils n'existent pas dans les cellules somatiques.

Il semble donc qu'il y ait un programme génétique commun entre ces deux processus prolifératifs qui demande à être compris en terme mécanistique et de régulation transcriptionnelle. Les CTA étant régulés épigénétiquement, notamment par déméthylation, il serait intéressant de comparer les profils de méthylation de ces gènes lors de la spermatogénèse et la tumorigénèse, afin éventuellement de mettre en évidence des régulateurs communs qui seraient en soit d'excellentes cibles pour freiner l'évolution des cancers, et ceci d'autant plus que l'expression de tous ces CTAs corrèle avec un très mauvais pronostic chez les patients les exprimant.

CT55 représente donc un exemple original d'une protéine impliquée dans des fonctions mitochondriales et dans la prolifération cellulaire de tissus très particuliers, qui soulève autant de questions sur son mode de fonctionnement, que de promesses pour le traitement des cancers qui l'expriment.

Fiches techniques

Fiche technique n°1 : Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées.....	97
Fiche technique n°2 : Culture cellulaire et transfection des siRNA.....	99
Fiche Technique n°3 : Évaluation de la viabilité cellulaire (Incucyte, Crystal Violet et ATP Lite).....	100
Fiche technique n°4 : Dosage de protéines et Western Blot.....	101
Fiche technique n°5 : Extraction d'ADN et quantification de l'ADNmt.....	103
Fiche technique n°6 : Extraction d'ARN et RT-qPCR.....	104
Fiche technique n°7 : Microscopie à fluorescence – Live / Immunofixation.....	105
Fiche technique n°8 : Immunofixation sur lames de tissus paraffinées.....	107
Fiche technique n°9 : Immunoprécipitation.....	109

Fiche Technique n°1 : Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées

Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées :

La lignée UACC62 est le principal modèle utilisé, ses caractéristiques complètes sont présentées ci-dessous. Les caractéristiques des autres lignées cellulaires utilisées sont résumées dans le tableau ci-après.

UACC62

Nom complet: University of Arizona Cell Culture-62

Inclue dans les projets: Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) project (<https://portals.broadinstitute.org/ccle/>);

MD Anderson Cell Lines Project

(<https://tcpaportal.org/mclp/>); NCI60 cancer cell line panel

(https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/cell_list.html)

Temps de doublement: 31,3 h

Type de cellules : adhérentes

Milieu : High glucose + 10% SVF + 1% glutamine + 1% sodium pyruvate

Pathologie : mélanome

Tissu : peau

Espèce : Homo sapiens (Homme)

Sexe des cellules : indéterminé

Catégorie : lignée cellules cancéreuses

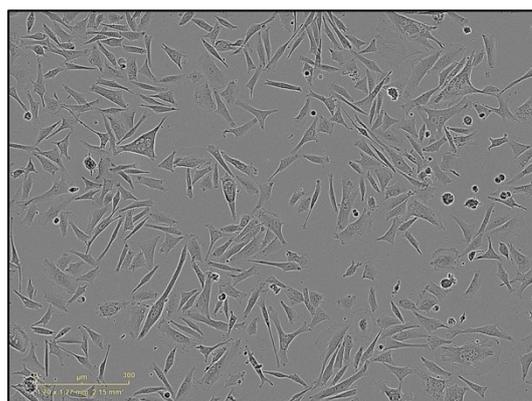


Figure 25: Photo représentant les cellules UACC62 prise grâce à l'Incucyte ZOOM (x10).

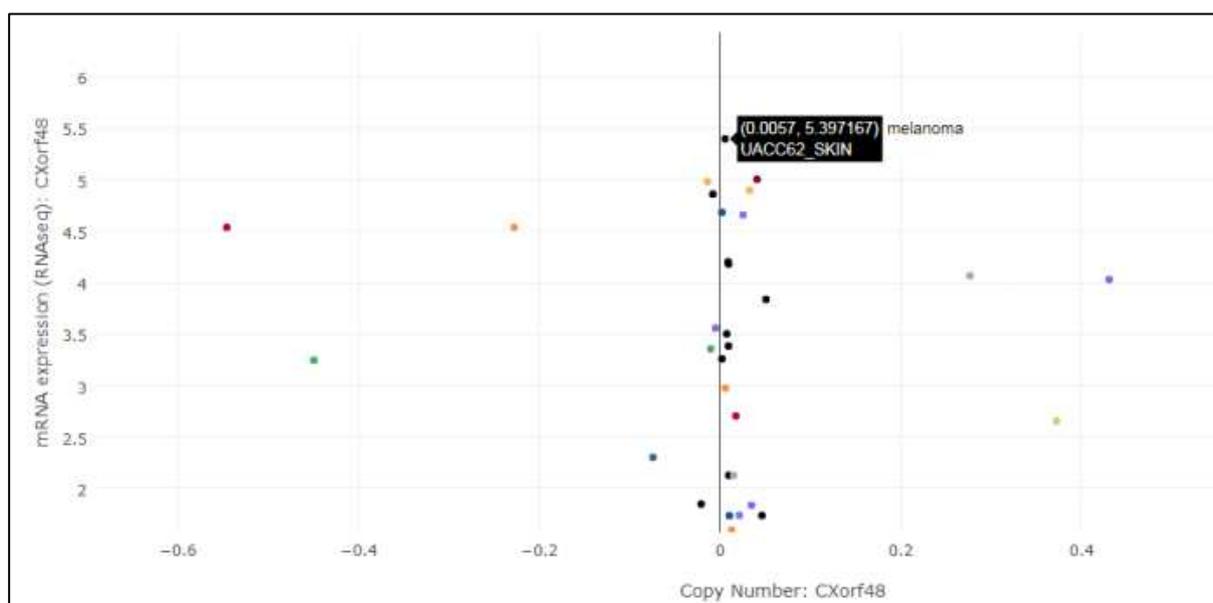


Figure 26: Expression de CXorf48 (CT55) dans les UACC62 selon CCLE - Cancer Cell Line Encyclopedia (1457 lignées cellulaires) (<https://portals.broadinstitute.org/ccle/>)

Comparaison des autres lignées cellulaires utilisées :

Lignées	UACC62	SNB75	SKMEL-2	HeLa	HCT-116
Nom	University of Arizona Cell Culture-62	Surgical Neurology Branch-75 SNB-75 (RRID:CVCL_1706)	Skin Melanome 2 ATCC® HTB-68™	HeLa (ATCC® CCL-2™)	HCT 116 (ATCC® CCL-247™)
Pathologie	Mélanome	Glioblastome	Mélanome	Adénocarcinome	Carcinome colorectal
Tissu	Peau	Cerveau	Peau	Col utérus	Colon
Provenance individu	Indéterminé	♀ / 75 ans	♂ / 60 ans / caucasien	♀ / 31 ans	♂ / adulte
Milieu	High Glucose + 10% SVF + 1% glutamine + 1% sodium pyruvate				
Expression CT55	Oui (CCLE)	Non (CCLE)	Oui (non présent dans CCLE)	Non	Non (non présent dans CCLE)

Fiche Technique n°2 : Culture cellulaire et transfection des siRNA

Réactifs :

DMEM High Glucose (4,5g/L – PAN Biotech; #P0403500)

SVF (PAN Biotech; #P141005)

Trypsine-EDTA (10X 0,5%/0,2% - PAN Biotech; #P10-024100)

Sodium Pyruvate (100mM – Gibco ; #11360-093)

L-Glutamine (100X – Dutscher ; #MS00171008)

Conditions de culture et culots cellulaires :

Les cellules sont cultivées à 37°C, en atmosphère humide avec 5% de CO₂. Plusieurs types cellulaires ont été utilisés, principalement des UACC62 dont les caractéristiques sont décrites ci-dessous, les autres lignées cellulaires sont résumées dans le tableau ci-après. Les UACC62 sont cultivées dans un milieu DMEM High Glucose supplémenté avec 10% de SVF, 1mM de Sodium Pyruvate et 1 mM de L-Glutamine. Pour la réalisation des culots, les cellules sont trypsinées puis reprises par du milieu et centrifugées à 800g pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS 1X et centrifugées de nouveau (5 minutes, 800g). Le surnageant est retiré et les culots de cellules sont congelés immédiatement dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

Transfection des siRNAs :

Pour obtenir une diminution de l'expression de CT55, les cellules sont transfectées avec des siRNA dirigés contre CT55 (SR310386; Origene - 5nM), et comparées avec des cellules transfectées avec un siRNA Ctrl (SR30004 ; Origene - 5nM) en tant que contrôle négatif grâce à la Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Les cellules UACC62 sont trypsinées, comptées et déposées à 50 000 cellules/puits dans une plaque 6 puits. Lorsque les cellules ont adhéré, 24h plus tard, le mix de transfection est réalisé. Pour cela, pour 1 puits : 1,25 ul de siRNA (10uM) est dilué dans 125 ul de milieu sans SVF d'une part, 3,75ul de lipofectamine est diluée dans 125ul de milieu sans SVF d'autre part. Ensuite, la lipofectamine diluée est ajoutée aux siRNAs (volume à volume), le tout formant le mix de transfection qui doit être incubé pour au moins 15min à température ambiante afin de former les lipocomplexes. Enfin, 250ul du mix de transfection est ajouté aux cellules et les plaques sont replacées à incubation. L'efficacité de transfection est vérifiée par RTqPCR et analyse de Western Blot après 3 jours de transfection.

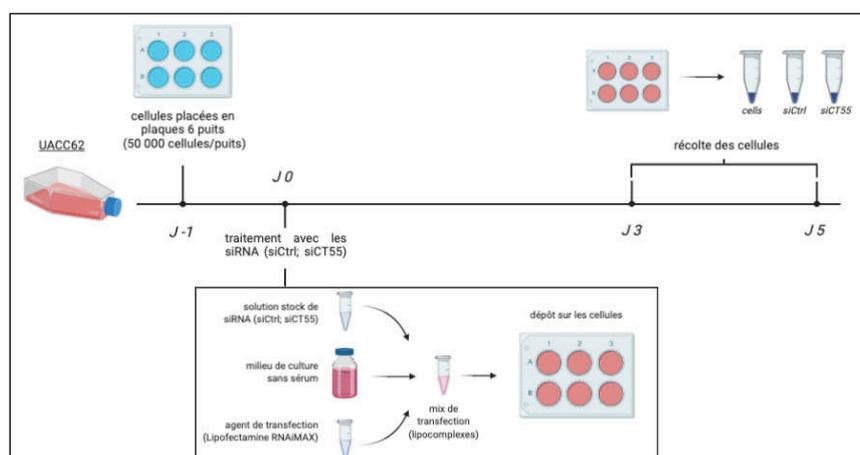


Figure 27: Schéma représentant le protocole de transfection de siARN utilisé

Fiche Technique n°3 : Évaluation de la viabilité cellulaire (IncuCyte, Crystal Violet et ATP Lite)

1) IncuCyte

L'IncuCyte® S3 (EssenBioscience) est un système de prise d'images et d'analyse de cellules vivantes. Les cellules sont maintenues dans des conditions standard de culture (37°C, atmosphère humide et 5% de CO₂). La densité et la forme des cellules sont observés par microscopie photonique. Des images en temps réel des cellules vivantes sont prises toutes les 2h, en flask ou en puits. Pour analyser la viabilité cellulaire, la confluence est automatiquement calculée pendant la durée de l'acquisition en utilisant un masque d'analyse basique grâce au logiciel IncuCyte® S3 software 2019B.

Pour étudier pendant 5 jours la prolifération cellulaire des cellules non traitées (cells), traitées avec un siRNA contrôle (siCtrl) ou avec un siRNA dirigé contre CT55 (siCT55), les cellules sont déposées dans des plaques 6 puits à une densité de 50000 cellules/puits. 24h plus tard, elles sont traitées ou non avec les siRNAs et placées dans l'IncuCyte® S3 pour 5 jours.

2) Crystal Violet

Le Crystal Violet est un colorant qui se lie à l'ADN et aux protéines dans les cellules et permet ainsi la visualisation des cellules adhérentes. En effet, les cellules mortes se détachent des plaques de culture et sont éliminées pendant les multiples étapes de lavage. Cette coloration peut donc être utilisée pour quantifier l'ADN total de la population restante et ainsi déterminer la viabilité cellulaire. La coloration est directement proportionnelle au nombre de cellules dans la culture et peut être mesurée à 570 nm.

Pour cette analyse, les cellules sont cultivées et traitées dans une plaque 6 puits pendant 3 jours ou 5 jours. Le surnageant est ensuite retiré et les cellules sont fixées avec du PFA4% (paraformaldehyde + PBS) pendant 15 min avec 3ml/puits. Après un lavage avec de l'eau avec 1ml/puits, les cellules sont colorées avec une solution de Crystal Violet staining 0.1% pendant 20 min avec 500ul/puits, lavées au moins 3x avec de l'eau à 1ml/puits, séchées et une photo est prise pour illustration. Pour la quantification, 2ml d'Acide Acétique 10% sont ajoutés dans chaque puits et le tout est laissé à incuber pendant au moins 20 min sous agitation pour dissolution et distribué dans une plaque 96 puits avec 100ul par puits. Mesurer l'absorbance à 590 nm sur le spectrophotomètre CLARIOstar® (BMG Labtech).

3) ATP Lite

L'ATP, présent dans les cellules métaboliquement actives est un marqueur de la viabilité cellulaire. L'ATP réagit avec la luciférase du kit et la D-luciférine qui permet d'émettre une lumière proportionnelle à la concentration d'ATP. Les cellules traitées ou non avec les siRNAs (siCtrl et siCT55) pour 3 et 5 jours sont déposées dans des plaques 96puits en triplicat. Le réactif du kit ATPlite 1-step kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) est ajouté à 100ul/puits, incubé pour 5min puis la luminescence est observée.

Fiche Technique n°4 : Dosage de protéines et Western Blot

Réactifs :

Kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher ; #23227) avec solution de standard de BSA (Bovine Serum Albumine) incluse : 1mg/ml

Antiprotéase (*Protease Inhibitor Cocktail tablets* – Roche; #11836145001): 25X

Marqueur de poids moléculaire : PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific)

Tampon échantillon 4X (Laemmli Sample Buffer – BioRad; #161-0747)

β -Mercaptoéthanol (Sigma Aldrich): 0,6M

Tampon électrophorèse, pH=8,3 (Tris (Sigma Aldrich) : 25mM ; Glycine (Sigma Aldrich) : 192mM - SDS (Eurobio) : 0,1%)

nUView Precast Gels Tris-Glycine 4-20% (NuSep; #NN12-420)

Tween 20 (BioRad ; #170653)

Transblot® Turbo™ Transfer Pack – 0,2um PVDF (BioRad; #1704156)

Supersignal™ West Femto (ThermoFisher; #34096)

Protocole :

Les culots cellulaires frais ou conservés à -80°C sont décongelés et les cellules sont lysées avec un tampon de lyse (Lysis buffer) dans lequel est ajouté un inhibiteur de protéase 25X pour une concentration finale de 1X. Les suspensions cellulaires sont laissées dans la glace pendant 30 min puis centrifugées à 13000rpm pendant 5min. L'ADN et les noyaux précipitent au fond, le surnageant, comprenant les protéines est transféré dans un nouveau tube.

Pour le dosage de protéines :

Une gamme référence de BSA est préparée à partir de la solution mère de BSA à 2mg/ml (0.125mg/ml, 0.250mg/ml, 0.5mg/ml). Plusieurs dilutions successives des échantillons sont effectuées de manière à ce que les valeurs se situent la gamme de mesures. 10 μ l du blanc, des points de gamme (en duplicats) ou des échantillons sont alors déposés dans les puits d'une plaque 96 puits. La solution de travail est réalisée : le réactif B est dilué au 50ème dans le réactif A et 200 μ l de la solution obtenue sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée pendant 30 minutes à 37°C puis l'absorbance est mesurée à 562nm à l'aide d'un spectrophotomètre CLARIOstar® (BMG Labtech).

Pour le western-blot :

De 10 à 50 μ g de protéines sont utilisés pour le dépôt selon l'expression de la protéine d'intérêt. Un volume de tampon de charge 4X est ajouté et l'échantillon est dénaturé par chauffage (5 minutes à 95°C). La totalité des échantillons et le marqueur de taille (5 μ l) sont déposés dans les puits d'un gel précoulé Tris-Glycine 4-20% (NuSep).

Pour l'électrophorèse, les protéines sont séparées par électrophorèse sur gels dénaturants (SDS) pendant environ 1h à 1h30 à 110 volts. Le transfert semi-sec est réalisé sur membrane de PVDF (fluorure de polyvinylidène). La

membrane PVDF, imbibée dans du tampon de transfert rapide est placée dans une cassette de l'appareil de transfert (TransBlot® Turbo, Transfer System ; BioRad) entre deux éponges. Un courant constant de 20V est appliqué pendant 7 minutes.

Pour l'immunomarquage, la membrane est saturée pendant minimum 2h avec du lait 5% dilué dans du TBS 1X-Tween 0,1% à température ambiante. La membrane est lavée 3 fois 5 minutes avec du TBS1X-Tween 0,1% et incubée avec l'anticorps primaire (dirigé contre la protéine d'intérêt) selon la dilution souhaitée dans du TBS1X-Tween 0,1% pendant minimum 2h à température ambiante ou toute la nuit en chambre froide sous agitation lente. La membrane est ensuite rincée 3x 10 min dans du TBS1X-Tween 0,1% puis incubée avec l'anticorps secondaire (couplés au substrat de la HRP) à une dilution de 1/1000^e dans du TBS1X-Tween 0,1%. Elle est ensuite rincée 3x 10 min dans du TBS1X-Tween 0,1% et incubée dans du TBS1X seul pour la révélation.

Celle-ci s'effectue par chimiluminescence. Dans ce cas, le kit femto (Pierce) est utilisé. Pour cela, une solution de révélateur est préparée en mélangeant à volume 1:1 la solution A et B et déposée sur la membrane. L'image est acquise grâce à un imageur de type Li-Cor Odyssey® FC (Biosciences).

Fiche Technique n°5 : Extraction d'ADN et quantification de l'ADNmt

Réactifs :

iTaq™ Universal SYBR® Green SuperMix (BioRad® - #1725124)
High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche - #11796828001)

Protocole :

La PCR quantitative permet l'amplification de la séquence d'ADN cible et la quantification de l'amplicon formé grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente. Pour la préparation des échantillons, des culots cellulaires frais ou conservés à -80°C sont décongelés et leur ADN est obtenu par extraction avec le kit High Pure PCR Template Preparation Kit.

Les concentrations d'ADN sont dosées grâce au spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific). Les ADN des différents échantillons sont ensuite dilués à 10ug/ul dans de l'eau stérile. Les gènes mitochondriaux (ND1 ; Cytb) et nucléaire (B2M -β2 microglobuline- ; GAPDH) sont quantifiés par PCR quantitative en temps réel. Les séquences des amorces utilisées sont décrites dans le tableau de la Fiche Technique n°6 ci-après.

Pour chaque condition, un mix réactionnel est réalisé comprenant : 2 µl d'ADN issu de l'extraction d'ADN dilué; 0,5 µl d'amorce sens *Forward* (F) ; 0,5 µl d'amorce anti-sens *Reverse* (R); 5 µl de mix de SybrGreen (iQ Sybr green Supermix) et 2 ul d'eau sétrile et déposé dans une plaque 96 puits.

Pour l'amplification, la plaque est ensuite centrifugée et placée dans le thermocycleur Chromo 4 real-time PCR detector et le programme d'amplification utilisé est le suivant : - 95°C pendant 10 min, puis : Dénaturation : - Température : 95°C - 10 s ; Hybridation : - Température : 59°C - 15 s ; Elongation : - Température : 72°C- 20 s - Nombre de cycles : 45 cycles.

La fluorescence émise est détectée par un spectrofluorimètre. Elle est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée. Pour la quantification de l'ADN mitochondrial, des amorces de gènes mitochondriaux permettent détection de l'ADN mitochondrial et des amorces de gènes nucléaires pour la détection de l'ADN nucléaire. La mesure de la quantité d'ADN mitochondrial est calculée en rapportant les valeurs de l'amplification des gènes mitochondriaux aux gènes nucléaires qui sont des « références de charge ».

Fiche Technique n°6 : Extraction d'ARN et RT-qPCR

Réactifs :

RNeasy Mini Kit (Qiagen - #74804)

SuperScript™ II Reverse Transcriptase (ThermoFisher - #18054014)

iTaq™ Universal SYBR® Green SuperMix (BioRad® - #1725124)

Protocole :

La PCR quantitative permet l'amplification de la séquence d'ADN cible et la quantification de l'amplicon formé grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente. Pour la préparation des échantillons, l'ARN des culots cellulaires frais ou conservés à -80°C décongelés sont obtenus par extraction avec le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen - #74804).

Les concentrations d'ARN sont dosées grâce au spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific). Les ARN sont ensuite rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) grâce au kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase. Le programme de reverse transcription contient un cycle de 30min à 42°C et 3min à 95°C permettant la dissociation de l'enzyme. Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C. Les différents échantillons d'ADN sont dilués à 10ug/ul dans de l'eau stérile. Les transcrits des gènes d'intérêt et des gènes de référence sont quantifiés par PCR quantitative en temps réel. Les séquences des amorces utilisées sont décrites dans le tableau de la Fiche Technique n°6 ci-après. Pour chaque condition, un mix réactionnel est réalisé comprenant : 2 µl d'ADNc dilué; 0,5 µl d'amorce sens *Forward* (F) ; 0,5 µl d'amorce anti-sens *Reverse* (R); 5 µl de mix de SybrGreen (iQ Sybr green Supermix) et 2 ul d'eau stérile et déposé dans une plaque 96 puits.

Pour l'amplification la plaque est ensuite centrifugée et placée dans le thermocycleur Chromo 4 real-time PCR detector et le programme d'amplification utilisé est le suivant : Activation : - Température : 95°C pendant 10 min, puis : Dénaturation : - Température : 95°C - 10 s ; Hybridation : - Température : 59°C - 15 s ; Elongation : - Température : 72°C- 20 s - Nombre de cycles : 45 cycles. La fluorescence émise est détectée par un spectrofluorimètre. Elle est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée et donc à l'expression du gène d'intérêt dans un échantillon.

Liste des primers utilisés :

Nom gène	Séquence primers 5'-3'	
	Forward	Reverse
Actin	GACGACATGGAGAAAATCT	ATGATCTGGGTCATCTTCTC
B2M1	TCCAGCGTACTCCAAAGATTCAGG	AGTCAACTTCAATGTCGGATGGATG
B2M2	CAGCAAGGACTGGTCTTCTATCTC	TCTCGATCCCACTTAACTATCTTGGG
CT552	CTGTGAAGCCCATCCGTTGTATTC	CTCTCCACCATGACCACATTGACG
B2M mouse	AAATGCTGAAGAACGGGA	ATAGAAAGACGAGTCCTTGCTGAAG
CT55 mouse 1	GGAAGATGCTACCTCACTACAAAAC	CATTATCCACTGTGACTGCGTT
CT55 2 mouse	TAAATGAGGTCCGTGTTACCAGA	CTACAATACTTGTACTGGGGTCATTG
GAPDH	ACAGTTGCCATGTAGACC	TTTTTGGTTGAGCACAGG
CT55	CCCTCAGACTCAGGAACCAGAGT	AGATGCCTGGCTCAGTGGAATATTC

Fiche Technique n°7 : Microscopie à fluorescence (live et immunofixation)

Réactifs :

BSA Bovine Serum Albumine (SIGMA; #A6003)

DPBS 10X (PAN BIOTECH; #P04-53500)

Tween20 : Tween 20 (BioRad ; #170653)

MitoTracker™ Red FM (Invitrogen; #M22425)

DAPI (Thermofisher ; #H3570)

Anti-CXorf48 antibody (Abcam ; #ab69317)

Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Invitrogen; #A11001)

1) Imagerie sur cellules vivantes (Live-cell Imaging)

Les cellules (avec ou sans traitement/transfection) sont déposées dans des chambres 4 puits (80427, Ibidi) à une densité de 5000 cellules/puits et placées à incuber dans des conditions standards de culture (37°C, en atmosphère humide avec 5% de CO₂) au minimum 24h avant la prise d'images pour permettre l'adhérence des cellules. Pour la détection des mitochondries, le Mitotracker Red (Molecular Probes) est ajouté dans les puits à une concentration de 50nM, incubé 5min à 37°C avant observation.

2) Immunofixation

Pour la préparation des cellules, les lentilles adaptées à la taille du puits sont lavées dans l'éthanol et placées dans une plaque 24 puits. Les lentilles sont ensuite lavées dans du PBS-1X puis placées dans une nouvelle plaque. Pour les UACC62, 20 000 cellules par puits sont déposées dans une plaque 24 puits, sur les lentilles.

Jour 1

Après la culture (au moins 24h pour laisser les cellules adhérer), le surnageant des cellules est retiré et les cellules sont lavées avec du PBS-1X pendant 5min.

Les cellules sont ensuite fixées avec PFA4% avec 500ul/puits pendant 15 min à température ambiante puis lavées avec du PBS-1X 3x5min avec 500 ul.

Les cellules sont perméabilisées avec de l'éthanol 70% avec 500 ul/puits pendant 5 min à température ambiante et lavées avec du PBS-1X 3x5min avec 500 ul.

Pour l'étape de saturation, une solution de PBS-BSA 1% est ajoutée avec 500ul/puits pendant 30 min à température ambiante.

Enfin, l'anticorps primaire (Ac I) est préparé dans la solution de saturation (dilution 1/250^e pour CT55) puis incubé pendant au moins 3h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C dans l'obscurité.

Jour 2

L'anticorps primaire est lavé 3x 5 min avec du PBS-1X avec 500ul/puits et l'anticorps secondaire de la longueur d'onde choisie est ajouté (dilution 1/250^e dans la solution de saturation) avec 500 ul pendant au moins 1h à température ambiante.

L'anticorps secondaire est ensuite lavé 3x5 min avec du PBS-1X avec 500ul/puits puis (pour le marquage des noyaux), le DAPI (dilution 1/500^e dans la solution de saturation) est incubé pendant 5min à température ambiante, dans l'obscurité et les puits sont lavés avec du PBS avec 500ul/puits.

Pour le montage, sur une lame, une goutte de Mowiol est déposée et les lentilles sur lesquelles les cellules sont fixées sont délicatement déposées sur la goutte de Mowiol et soudées avec du vernis puis laissées à sécher (à 4°C dans l'obscurité jusqu'à observation. Sortir la lame quelques minutes auparavant pour qu'elle soit à température ambiante.

Fiche Technique n°8 : Immunofixation sur lames de tissus paraffinées

Référence lame

Coupes paraffinées de testicule humain normal – Amsbio (ref HP-401)

Les coupes sont réalisées à partir de tissu frais, fixées avec la formalin à 10%. Les blocs de parafines sont coupés à une épaisseur de 5 microns et montés sur des lames (2 à 4 coupes par lame selon la taille du tissu).

Réactifs

BSA Bovine Serum Albumine (SIGMA; #A6003)

DPBS 10X (PAN BIOTECH; #P04-53500)

Tween 20 (BioRad ; #170653)

DAPI (Thermofisher ; #H3570)

Anti-CXorf48 antibody (Abcam ; #ab69317)

Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Invitrogen; #A11001)

Préparation de la solution

Tampon démasquage Acide (Tampon de Sodium citrate (10 mM Sodium citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0)) :

- Tri-sodium citrate (dihydrate) 2.94 g
- Eau distillée 1 L
- Mélanger pour dissoudre et ajuster le pH à 6.0 avec HCl 1N
- Ajouter 0,5mL de Tween 20 et bien mélanger.

Cette solution peut être conservée à température ambiante pour 3 mois ou à 4°C pour un stockage plus long.

Protocole

Jour 1

Les lames sont transférées dans plusieurs bains successifs comme suit : 2 x 10 min dans le xylène ; 2 x 5 min dans l'EtOH absolu ; 2min dans l'EtOH 95° ; 2min dans l'EtOH 70° ; au moins 5 min dans l'eau. Les lames sont ensuite lavées au PBS 1X – Triton 0.1% (environ 200 µl /puits) pendant 5 min.

Pour le démasquage, la méthode au micro-ondes a été utilisée. :

Pour cela, tampon de démasquage acide préalablement préparé a été placé dans un récipient micro-ondable avec un volume suffisant de sorte que la lame ne sèche pas et soit toujours immergée.

Les lames déparaffinées sont placées dans le récipient au micro-ondes jusqu'à atteindre 95°C pendant 15-20 min.

Les lames sont ensuite transvasées dans une solution d'eau stérile légèrement chauffée pour refroidir doucement la lame. En faisant attention à ce que les puits restent toujours hydratés (afin d'éviter l'autofluorescence), des puits sont formés autour des coupes avec un stylo hydrophobe.

Pour l'étape de perméabilisation, les lames sont placées 1h dans une solution de perméabilisation (PBS 1X – Triton 0.1% + 5% BSA) à environ 200 µl /puits.

Pour l'étape de saturation, les lames sont placées 30 min dans une solution de saturation (PBS 1X – 5% BSA) à environ 200 µl /puits. Le mix d'anticorps primaire (dilution 1/200^e) est ensuite ajouté (environ 200 µl /puits) pour une incubation toute la nuit à 4° en chambre noire humide.

Jour 2

Les coupes sont lavées 3 x 5min dans du PBS 1X – Triton 0.1% puis le mix d'anticorps secondaire fluo 488 Alexa Fluor Goat anti-mouse (car Ac I : CT55 mouse) est ajouté (dilution 1/200^e) (environ 200 µl /puits) pour une incubation en chambre humide pendant 1h30-2h à température ambiante le plus au noir possible.

Les coupes sont lavées 3 x 5min dans du PBS 1X et le mix DAPI (dilution 1/1000^e) (environ 200 µl /puits) en chambre humide pendant 5 min à température ambiante. Enfin, les coupes sont lavées 3 x 5min dans du PBS 1X et séchées avec la pompe à vide, en faisant attention de ne pas toucher aux coupes pour ne pas les abimer.

La lamelle est ensuite montée sur la lame avec quelques gouttes de Mowiol dans chaque puits et les lames sont séchées pendant au moins 1 heure et jusqu'à observation à 4°C dans l'obscurité en chambre humide avant d'être observées.

Fiche Technique n°9 : Immunoprécipitation

Réactifs :

Trap Magnetic Agarose Kit (Chromotek; #gtmak-20)

Antiprotéase (*Protease Inhibitor Cocktail tablets* – Roche; 11836145001): 25X

Tampon électrophorèse, pH=8,3 (Tris (Sigma Aldrich) : 25mM ; Glycine (Sigma Aldrich) : 192mM – SDS (Eurobio) : 0,1%)

nUView Precast Gels Tris-Glycine 4-20% (NuSep; NN12-420)

Pierce™ Silver Stain Kit (ThermoFisher Scientific; #24612)

Protocole :

Pour la réalisation des culots cellulaires, les cellules sont centrifugées à 1500 g à 4°C pendant 5 minutes. Le culot est lavé avec 1 mL de PBS 1X, puis une autre centrifugation est effectuée à 8000g à 4°C pendant 5 minutes.

Pour la lyse des cellules, un mix composé de 100 µL de tampon de lyse et 4 µL d'inhibiteur de protéases (IP) 25X est ajouté au culot cellulaire. Le tout est incubé sur la glace pendant 30 minutes avec des agitations intermittentes.

Le lysat est ensuite centrifugé à 20000g pendant 5 minutes à 4°C, puis le surnageant contenant les protéines est récupéré. Un mix composé de 150 µL de tampon de lavage et 6 µL d'IP est ajouté aux protéines. 10µL du lysat sont prélevés et conservés à -20°C pour être chargés sur SDS-PAGE ultérieurement (input).

Pour la fixation des anticorps, 2,5 µL d'anticorps primaire est ajouté au mix et placé à incuber sous agitation par retournement pendant au moins 3h à température à 4°C. 15 µL d'anticorps secondaire couplé aux billes magnétiques sont ajoutés, puis l'échantillon est placé à incuber à température ambiante pendant au moins 1 heure. Les billes sont immunoprécipitées par un aimant, puis lavées par un tampon de lavage. Le lavage est répété 3 fois.

Les billes sont ensuite reprises par du SDS, chauffées à 95°C pendant 5 min, puis centrifugées. L'échantillon est ensuite déposé sur gel et soumis à un SDS-PAGE. La migration est effectuée à 140V dans un tampon d'électrophorèse pendant au moins 1h30.

Pour la révélation, le gel est lavé 2x5 min dans l'eau ultrapure. Le gel est ensuite fixé 2x15 min dans une solution composée de :30% d'éthanol, 10% d'acide acétique puis lavé 2x5 min dans l'éthanol 10% et 2x 5min dans l'eau ultrapure. La solution de sensibilisation (Sensitizer Working Solution) est diluée avec 50ul dans 25ml d'eau. Le gel est sensibilisé pour 1min et lavé 2x1 min avec de l'eau. La solution de coloration (Stain Solution) est préparée avec 25mL de solution de coloration et 500 µL d'amplificateur. Le gel est coloré pendant 30 min. La solution de révélation est préparée avec 25mL de solution de révélation et 500 µL d'amplificateur. Le gel est ensuite lavé 2x20 sec avec de l'eau ultrapure et le gel est révélé pendant 2 à 3 min jusqu'à l'apparition des bandes. La réaction de révélation est ensuite stoppée avec de l'acide acétique pendant 10min.

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma représentant la structure interne de la mitochondrie, ses membranes, ses compartiments et les principaux éléments la composant.....	3
Figure 2 : Représentation de microscopie électronique de mitochondries dans deux conformations structurales différentes.....	4
Figure 3 : La dynamique mitochondriale est corrélée à la morphologie de l'organite.....	4
Figure 4 : Les mécanismes de fission et de fusion chez les mammifères.....	6
Figure 5 : Schéma représentant le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons.....	9
Figure 6 : Schéma représentant le génome mitochondrial humain.....	11
Figure 7 : Schéma représentant les protéines nécessaires à la réplication de l'ADNmt.....	13
Figure 8 : Schéma représentant les protéines impliquées dans les voies principales de régulation du pool de dNTP régulant la réplication de l'ADNmt : la voie de synthèse de novo et la voie de récupération des dNTP.....	16
Figure 9 : Les contacts entre le RE et la mitochondrie permettent la synthèse d'ADNmt au niveau des sites de division mitochondriale.....	17
Figure 10 : Tableau présentant les principales protéines retrouvées dans les MAM de cellules de mammifères...	23
Figure 11 : Principales fonctions recensées des MAM : zones de contact entre RE et mitochondrie.....	24
Figure 12 : Tableau présentant les pathologies associées à des protéines localisées dans les MAM en lien avec leur fonction cellulaire.....	25
Figure 13 : Principales translocases permettant l'import des pré-protéines dans la membrane interne et la matrice mitochondriale.....	28
Figure 14 : La translocation co-traductionnelle dépendante de SRP.....	31
Figure 15 : La translocation post-traductionnelle vers le RE.....	32
Figure 16 : Schéma de la stratégie d'identification de la corrélation entre CT55 et l'ADNmt.....	35

Figure 17 : Schéma représentant les structures génomique et protéique des deux isoformes de CT55 : CT55.1a et CT55.1b.....	55
Figure 18 : Le réseau mitochondrial n'est pas modifié par l'inhibition de l'expression de CT55.....	83
Figure 19 : La morphologie et la taille des mitochondries ne sont pas modifiées par une diminution de l'expression de CT55.....	83
Figure 20 : Identification et annotations des domaines de CT55.....	86
Figure 21 : Similarité de séquence entre CT55 et MOV10L.....	87
Figure 22 : Interactions de CT55 avec des protéines du RE, de la mitochondrie et des vésicules.....	88
Figure 23 : CT55 est principalement exprimé dans les testicules et les ovaires.....	89
Figure 24 : Représentation schématique des structures, des composants et fonctions de biogenèse des piARN dans les cellules germinales.....	93
Figure 25 : Photo représentant les cellules UACC62 prise grâce à l'Incucyte ZOOM (x10).....	97
Figure 26 : Expression de CXorf48 (CT55) dans les UACC62 selon CCLE – Cancer Cell Line Encyclopedia (1457 lignées cellulaires) (https://portals.broadinstitute.org/ccle).....	97
Figure 27 : Schéma représentant le protocole de transfection de siRNA utilisé.....	99

Autres activités

Publications

- Aurriere, J., Lenaers, G., Khiati, S., Les CTA (cancer/testis antigens) : cibles pour l'immunothérapie des cancers. Innovations & Thérapeutiques en Oncologie. 2020;6(2):75-81. doi:10.1684/ito.2020.0205
- Aurrière, J., Goudenège, D., Baris, O.R., Boguenet, M., May-Panloup, P., Lenaers, G., Khiati, S., Cancer/Testis Antigens into mitochondria: a hub between spermatogenesis, tumorigenesis and mitochondrial physiology adaptation, Mitochondrion (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.11.002>
- Aurrière, J., Goudenège, D., Chabrun F., Perrot R., Baechler, S.A., Chevrollier A., Charif M., Pommier Y., Lenaers, G., Khiati, S. Cancer/Testis Antigen 55 regulates mitochondrial DNA copy number and maintains cell proliferation J Cell Science (manuscript in preparation)

Communications

- Meetochondrie – Pornichet 2018 (présentation affichée): « Identification of new regulators of mitochondrial DNA copy number »
- Journée de l'Institut MITOVASC – Angers 2019 (oral) : « Caractérisation fonctionnelle d'un nouveau facteur du maintien du génome mitochondrial : CT55 »
- Journée biomédicale Angers-Tours – Tours 2019 (présentation affichée): « Identification of a new regulator of mitochondrial DNA copy number »
- Journée scientifique de l'EDBS – Angers 2019 (présentation affichée): « Identification of a new regulator of mitochondrial DNA copy number »

Enseignement

- | | |
|-----------|--|
| 2018-2019 | Monitorat : 64h : Bioinformatique – LPBAE (IUT)
Tutrice pédagogique : 2 étudiantes Licence pro (projet tutoré et stage) (IUT) |
| 2019-2020 | Monitorat : 32h : Bioinformatique – LPBAE (IUT) |

Bibliographie

- Agrawal, V., and Kishan, K. (2003). OB-fold: Growing Bigger with Functional Consistency. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4, 195–206.
- Akhmedov, A.T., and Marín-García, J. (2015). Mitochondrial DNA maintenance: an appraisal. *Mol. Cell. Biochem.* 409, 283–305.
- Almagro Armenteros, J.J., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., von Heijne, G., Elofsson, A., and Nielsen, H. (2019). Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Sci. Alliance* 2, e201900429.
- Almeida, L.G., Sakabe, N.J., deOliveira, A.R., Silva, M.C.C., Mundstein, A.S., Cohen, T., Chen, Y.-T., Chua, R., Gurung, S., Gnjatic, S., et al. (2009). CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. *Nucleic Acids Res.* 37, D816–D819.
- Anand, R., Wai, T., Baker, M.J., Kladt, N., Schauss, A.C., Rugarli, E., and Langer, T. (2014). The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J. Cell Biol.* 204, 919–929.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465.
- Andrade, V.C.C., Vettore, A.L., Felix, R.S., Almeida, M.S.S., de Carvalho, F., de Oliveira, J.S.R., Chauffaille, M. de L.L.F., Andriolo, A., Caballero, O.L., Zago, M.A., et al. (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun. J. Acad. Cancer Immunol.* 8.
- Appenzeller-Herzog, C. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J. Cell Sci.* 119, 2173–2183.
- Avadhani, N.G., Sangar, M.C., Bansal, S., and Bajpai, P. (2011a). Bimodal targeting of cytochrome P450s to endoplasmic reticulum and mitochondria: the concept of chimeric signals. *FEBS J.* 278, 4218–4229.
- Avadhani, N.G., Sangar, M.C., Bansal, S., and Bajpai, P. (2011b). Bimodal Targeting of Cytochrome P450s to Endoplasmic Reticulum and Mitochondria: The Concept of Chimeric Signals. *FEBS J.* 278, 4218–4229.
- Babu, M.M. (2016). The contribution of intrinsically disordered regions to protein function, cellular complexity, and human disease. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 1185–1200.
- Bai, R.-K., and Wong, L.-J.C. (2005). Simultaneous Detection and Quantification of Mitochondrial DNA Deletion(s), Depletion, and Over-Replication in Patients with Mitochondrial Disease. *J. Mol. Diagn. JMD* 7, 613–622.
- Ban-Ishihara, R., Ishihara, T., Sasaki, N., Mihara, K., and Ishihara, N. (2013). Dynamics of nucleoid structure regulated by mitochondrial fission contributes to cristae reformation and release of cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11863–11868.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K., and Miyano, S. (2002). Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18, 298–305.
- Bard, F., Mazelin, L., Péchoux-Longin, C., Malhotra, V., and Jurdic, P. (2003). Src Regulates Golgi Structure and KDEL Receptor-dependent Retrograde Transport to the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 278, 46601–46606.
- Bartlett, K., and Eaton, S. (2004). Mitochondrial β -oxidation. *Eur. J. Biochem.* 271, 462–469.
- Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W., and Brunner, M. (2000). Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol.* 10, 25–31.
- Benda, C. (1898). Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertrebraten, II. Theil: Die Histiogenese der Spermien. *Arch Anat Physiol* 73, 393–398.
- Bender, A., Krishnan, K.J., Morris, C.M., Taylor, G.A., Reeve, A.K., Perry, R.H., Jaros, E., Hersheson, J.S., Betts,

- J., Klopstock, T., et al. (2006). High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat. Genet.* *38*, 515–517.
- Bereiter-Hahn, J. (1990). Behavior of Mitochondria in the Living Cell. In *International Review of Cytology*, (Elsevier), pp. 1–63.
- Berk, A.J., and Clayton, D.A. (1974). Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: Asynchronous replication of strands, segregation of circular daughter molecules, aspects of topology and turnover of an initiation sequence. *J. Mol. Biol.* *86*, 801–824.
- Bodył, A., and Mackiewicz, P. (2007a). Analysis of the targeting sequences of an iron-containing superoxide dismutase (SOD) of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* suggests function in multiple cellular compartments. *Arch. Microbiol.* *187*, 281–296.
- Bodył, A., and Mackiewicz, P. (2007b). Analysis of the targeting sequences of an iron-containing superoxide dismutase (SOD) of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* suggests function in multiple cellular compartments. *Arch. Microbiol.* *187*, 281–296.
- Bogenhagen, D.F. (2012). Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* *1819*, 914–920.
- Bola, B., and Allan, V. (2009). How and why does the endoplasmic reticulum move? *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 961–965.
- Bononi, A., Missiroli, S., Poletti, F., Suski, J.M., Agnoletto, C., Bonora, M., De Marchi, E., Giorgi, C., Marchi, S., Patergnani, S., et al. (2012). Mitochondria-Associated Membranes (MAMs) as Hotspot Ca²⁺ Signaling Units. In *Calcium Signaling*, Md.S. Islam, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 411–437.
- Brahimi, N., Jambou, M., Sarzi, E., Serre, V., Boddaert, N., Romano, S., de Lonlay, P., Slama, A., Munnich, A., and Rötig, A. (2009). The first founder DGUOK mutation associated with hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome. *Mol. Genet. Metab.* *97*, 221–226.
- de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* *456*, 605–610.
- Brown, W.M., George, M., and Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* *5*.
- Burté, F., Carelli, V., Chinnery, P.F., and Yu-Wai-Man, P. (2015). Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* *11*, 11–24.
- Busa, W.B., and Nuccitelli, R. (1985). An elevated free cytosolic Ca²⁺ wave follows fertilization in eggs of the frog, *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.* *100*, 1325–1329.
- Calvo, S.E., and Mootha, V.K. (2010). The Mitochondrial Proteome and Human Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *11*, 25–44.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell* *138*, 628–644.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* *160*, 189–200.
- Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2007). Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum. *Cell* *130*, 548–562.

- Chen, L., Liu, T., Tran, A., Lu, X., Tomilov, A.A., Davies, V., Cortopassi, G., Chiamvimonvat, N., Bers, D.M., Votruba, M., et al. (2012). OPA1 Mutation and Late-Onset Cardiomyopathy: Mitochondrial Dysfunction and mtDNA Instability. *J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* *1*.
- Chen, Y.-T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Türeci, Ö., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 1914–1918.
- Cheng, Y.-H., Wong, E.W., and Cheng, C.Y. (2011). Cancer/testis (CT) antigens, carcinogenesis and spermatogenesis. *Spermatogenesis* *1*, 209–220.
- Clapham, D.E. (2007). Calcium Signaling. *Cell* *131*, 1047–1058.
- Claros, M.G., and Vincens, P. (1996). Computational Method to Predict Mitochondrially Imported Proteins and their Targeting Sequences. *Eur. J. Biochem.* *241*, 779–786.
- Clay Montier, L.L., Deng, J., and Bai, Y. (2009). Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* *36*, 125–131.
- Clayton, D. (2003). Mitochondrial DNA Replication: What We Know. *IUBMB Life* *55*, 213–217.
- Copeland, W.C. (2012). Defects in Mitochondrial DNA Replication and Human Disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *47*, 64–74.
- Copeland, W.C., and Longley, M.J. (2014). Mitochondrial genome maintenance in health and disease. *DNA Repair* *19*, 190–198.
- Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., and Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J. Cell Biol.* *174*, 915–921.
- Cui, Z., Vance, J.E., Chen, M.H., Voelker, D.R., and Vance, D.E. (1993). Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. A specific biochemical and cytological marker for a unique membrane fraction in rat liver. *J. Biol. Chem.* *268*, 16655–16663.
- Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 870–879.
- Dong, X.-Y., Li, Y.-Y., Yang, X.-A., and Chen, W.-F. (2004). BJ-HCC-20, a potential novel cancer-testis antigen. *Biochem. Cell Biol.* *82*, 577–582.
- Doyle, S.R., Kasinadhuni, N.R.P., Chan, C.K., and Grant, W.N. (2013). Evidence of Evolutionary Constraints That Influences the Sequence Composition and Diversity of Mitochondrial Matrix Targeting Signals. *PLoS ONE* *8*.
- Dudek, J., Pfeffer, S., Lee, P.-H., Jung, M., Cavalié, A., Helms, V., Förster, F., and Zimmermann, R. (2015). Protein transport into the human endoplasmic reticulum. *J. Mol. Biol.* *427*, 1159–1175.
- Ekstrand, M.I. (2004). Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 935–944.
- Elachouri, G., Vidoni, S., Zanna, C., Pattyn, A., Boukhaddaoui, H., Gaget, K., Yu-Wai-Man, P., Gasparre, G., Sarzi, E., Delettre, C., et al. (2011). OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res.* *21*, 12–20.
- El-Hattab, A.W., and Scaglia, F. (2013). Mitochondrial DNA Depletion Syndromes: Review and Updates of Genetic Basis, Manifestations, and Therapeutic Options. *Neurotherapeutics* *10*, 186–198.
- El-Hattab, A.W., Craigen, W.J., and Scaglia, F. (2017). Mitochondrial DNA maintenance defects. *Biochim. Biophys.*

Acta BBA - Mol. Basis Dis. 1863, 1539–1555.

Franke, W.W., and Kartenbeck, J. (1971). Outer mitochondrial membrane continuous with endoplasmic reticulum. *Protoplasma* 73, 35–41.

Freitas, M.R.P., Malheiros, S.M.F., Stávale, J.N., Biassi, T.P., Zamunér, F.T., de Souza Begnami, M.D.F., Soares, F.A., and Vettore, A.L. (2013). Expression of Cancer/Testis Antigens is Correlated with Improved Survival in Glioblastoma. *Oncotarget* 4, 636–646.

Frey, T.G., and Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25, 319–324.

Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science* 334, 358–362.

Frost, R.J.A., Hamra, F.K., Richardson, J.A., Qi, X., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2010). MOV10L1 is necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11847–11852.

Fu, K., Tian, S., Tan, H., Wang, C., Wang, H., Wang, M., Wang, Y., Chen, Z., Wang, Y., Yue, Q., et al. (2019). Biological and RNA regulatory function of MOV10 in mammalian germ cells. *BMC Biol.* 17.

Gandhi, V.V., and Samuels, D.C. (2011). Enzyme Kinetics of the Mitochondrial Deoxyribonucleoside Salvage Pathway Are Not Sufficient to Support Rapid mtDNA Replication. *PLoS Comput. Biol.* 7.

Gaston, D., Tsaousis, A.D., and Roger, A.J. (2009). Chapter 2 Predicting Proteomes of Mitochondria and Related Organelles from Genomic and Expressed Sequence Tag Data. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 21–47.

Ge, D.T., Wang, W., Tipping, C., Gainetdinov, I., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2019). The RNA-Binding ATPase, Armitage, Couples piRNA Amplification in Nuage to Phased piRNA Production on Mitochondria. *Mol. Cell* 74, 982–995.e6.

Gerber, S., Charif, M., Chevrollier, A., Chaumette, T., Angebault, C., Kane, M.S., Paris, A., Alban, J., Quiles, M., Delettre, C., et al. (2017). Mutations in DNMI1, as in OPA1, result in dominant optic atrophy despite opposite effects on mitochondrial fusion and fission. *Brain* 140, 2586–2596.

Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M., and Wallace, D.C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 6715–6719.

Gray, M.W. (2012). Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.

Gross, N.J., Getz, G.S., and Rabinowitz, M. (1969). Apparent Turnover of Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid and Mitochondrial Phospholipids in the Tissues of the Rat. *J. Biol. Chem.* 244, 1552–1562.

Guda, C., Fahy, E., and Subramaniam, S. (2004). MITOPRED: a genome-scale method for prediction of nucleus-encoded mitochondrial proteins. *Bioinformatics* 20, 1785–1794.

Hance, N., Ekstrand, M.I., and Trifunovic, A. (2005). Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1775–1783.

Hansen, K.G., and Herrmann, J.M. (2019). Transport of Proteins into Mitochondria. *Protein J.* 38, 330–342.

Harbauer, A.B., Zahedi, R.P., Sickmann, A., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2014). The Protein Import Machinery of Mitochondria—A Regulatory Hub in Metabolism, Stress, and Disease. *Cell Metab.* 19, 357–372.

Hasgall, P.A., Hoogewijs, D., Faza, M.B., Panse, V.G., Wenger, R.H., and Camenisch, G. (2011). The Putative RNA Helicase HELZ Promotes Cell Proliferation, Translation Initiation and Ribosomal Protein S6 Phosphorylation. *PLoS ONE* 6.

Huang, H., Gao, Q., Peng, X., Choi, S.-Y., Sarma, K., Ren, H., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (2011). piRNA-AURRIERE Jade | Identification et caractérisation d'un *Cancer/Testis Antigen* mitochondrial : CT55

associated germline nuage formation and spermatogenesis require MitoPLD pro-fusogenic mitochondrial-surface lipid signaling. *Dev. Cell* 20, 376–387.

Iborra, F.J., Kimura, H., and Cook, P.R. (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol.* 14.

Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., and Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* 25, 2966–2977.

Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y., et al. (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat. Cell Biol.* 11, 958–966.

Ishihara, T., Ban-Ishihara, R., Maeda, M., Matsunaga, Y., Ichimura, A., Kyogoku, S., Aoki, H., Katada, S., Nakada, K., Nomura, M., et al. (2015). Dynamics of Mitochondrial DNA Nucleoids Regulated by Mitochondrial Fission Is Essential for Maintenance of Homogeneously Active Mitochondria during Neonatal Heart Development. *Mol. Cell. Biol.* 35, 211–223.

Kai, Y., Takamatsu, C., Tokuda, K., Okamoto, M., Irita, K., and Takahashi, S. (2006). Rapid and random turnover of mitochondrial DNA in rat hepatocytes of primary culture. *Mitochondrion* 6, 299–304.

Kasiviswanathan, R., Collins, T.R.L., and Copeland, W.C. (2012). The interface of transcription and DNA replication in the mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 970–978.

Kelly, R.D.W., Mahmud, A., McKenzie, M., Trounce, I.A., and St John, J.C. (2012). Mitochondrial DNA copy number is regulated in a tissue specific manner by DNA methylation of the nuclear-encoded DNA polymerase gamma A. *Nucleic Acids Res.* 40, 10124–10138.

Kolesar, J.E., Wang, C.Y., Taguchi, Y.V., Chou, S.-H., and Kaufman, B.A. (2013). Two-dimensional intact mitochondrial DNA agarose electrophoresis reveals the structural complexity of the mammalian mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.* 41, e58.

Korobova, F., Ramabhadran, V., and Higgs, H.N. (2013). An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2. *Science* 339.

Kühl, I., Miranda, M., Posse, V., Milenkovic, D., Mourier, A., Siira, S.J., Bonekamp, N.A., Neumann, U., Filipovska, A., Polosa, P.L., et al. (2016). POLRMT regulates the switch between replication primer formation and gene expression of mammalian mtDNA. *Sci. Adv.* 2.

Kunze, M., and Berger, J. (2015). The similarity between N-terminal targeting signals for protein import into different organelles and its evolutionary relevance. *Front. Physiol.* 6.

Kwon, C., Tak, H., Rho, M., Chang, H.R., Kim, Y.H., Kim, K.T., Balch, C., Lee, E.K., and Nam, S. (2014). Detection of PIWI and piRNAs in the mitochondria of mammalian cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 218–223.

van der Laan, M., Horvath, S.E., and Pfanner, N. (2016). Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 41, 33–42.

Larsson, N.-G., Wang, J., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., Barsh, G.S., and Clayton, D.A. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat. Genet.* 18, 231–236.

Lenaers, G., Hamel, C., Delettre, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., Reynier, P., and Milea, D. (2012). Dominant optic atrophy. *Orphanet J. Rare Dis.* 7, 46.

- Lewis, S.C., Uchiyama, L.F., and Nunnari, J. (2016). ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science* 353, aaf5549.
- Liu, Y., Dou, M., Song, X., Dong, Y., Liu, S., Liu, H., Tao, J., Li, W., Yin, X., and Xu, W. (2019). The emerging role of the piRNA/piwi complex in cancer. *Mol. Cancer* 18.
- Maine, E.A., Westcott, J.M., Prechtel, A.M., Dang, T.T., Whitehurst, A.W., and Pearson, G.W. (2016). The cancer-testis antigens SPANX-A/C/D and CTAG2 promote breast cancer invasion. *Oncotarget* 7, 14708–14726.
- Mancuso, M., Filosto, M., Bonilla, E., Hirano, M., Shanske, S., Vu, T.H., and DiMauro, S. (2003). Mitochondrial Myopathy of Childhood Associated With Mitochondrial DNA Depletion and a Homozygous Mutation (T77M) in the TK2 Gene. *Arch. Neurol.* 60, 1007.
- Mannella, C.A. (1992). The 'ins' and 'outs' of mitochondrial membrane channels. *Trends Biochem. Sci.* 17, 315–320.
- Mannella, C.A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1763, 542–548.
- Mannella, C.A. (2008). Structural Diversity of Mitochondria: Functional Implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 171–179.
- Marchi, S., Patergnani, S., Missiroli, S., Morciano, G., Rimessi, A., Wieckowski, M.R., Giorgi, C., and Pinton, P. (2018). Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium* 69, 62–72.
- Margulis, L. (1970). Origin of eukaryotic cells: evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth. (New Haven: Yale University Press).
- Matlack, K.E.S., Mothes, W., and Rapoport, T.A. (1998). Protein Translocation: Tunnel Vision. *Cell* 92, 381–390.
- Matsushima, Y., Goto, Y., and Kaguni, L.S. (2010). Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18410–18415.
- Matsushita, M., Ozawa, K., Suzuki, T., Nakamura, M., Nakano, N., Kanchi, S., Ichikawa, D., Matsuki, E., Sakurai, M., Karigane, D., et al. (2017). CXorf48 is a potential therapeutic target for achieving treatment-free remission in CML patients. *Blood Cancer J.* 7, e601.
- Matsushita, M., Saito, S., Yokoe, S., Ichikawa, D., and Hattori, Y. (2020). Characteristics of a Novel Target Antigen Against Myeloma Cells for Immunotherapy. *Vaccines* 8, 579.
- May-Panloup, P. (2003). Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Hum. Reprod.* 18, 550–556.
- McKinney, E.A., and Oliveira, M.T. (2013). Replicating animal mitochondrial DNA. *Genet. Mol. Biol.* 36, 308–315.
- Mei, H., Sun, S., Bai, Y., Chen, Y., Chai, R., and Li, H. (2015). Reduced mtDNA copy number increases the sensitivity of tumor cells to chemotherapeutic drugs. *Cell Death Dis.* 6, e1710–e1710.
- Milenkovic, D., Matic, S., Kühl, I., Ruzzenente, B., Freyer, C., Jemt, E., Park, C.B., Falkenberg, M., and Larsson, N.-G. (2013). TWINKLE is an essential mitochondrial helicase required for synthesis of nascent D-loop strands and complete mtDNA replication. *Hum. Mol. Genet.* 22, 1983–1993.
- Miller, F.J., Rosenfeldt, F.L., Zhang, C., Linnane, A.W., and Nagley, P. (2003). Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Res.* 31, e61.
- Missiroli, S., Patergnani, S., Carocchia, N., Pedriali, G., Perrone, M., Previati, M., Wieckowski, M.R., and Giorgi, C.

(2018). Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation. *Cell Death Dis.* 9.

Mitchell, A.L., Attwood, T.K., Babbitt, P.C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., Brown, S.D., Chang, H.-Y., El-Gebali, S., Fraser, M.I., et al. (2019). InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res.* 47, D351–D360.

Mollenhauer, H.H., and Morré, D.J. (1994). Structure of Golgi apparatus. *Protoplasma* 180, 14–28.

Morten, K.J., Ashley, N., Wijburg, F., Hadzic, N., Parr, J., Jayawant, S., Adams, S., Bindoff, L., Bakker, H.D., Mieli-Vergani, G., et al. (2007). Liver mtDNA content increases during development: A comparison of methods and the importance of age- and tissue-specific controls for the diagnosis of mtDNA depletion. *Mitochondrion* 7, 386–395.

Mulkey, R.M., and Zucker, R.S. (1991). Action potentials must admit calcium to evoke transmitter release. *Nature* 350, 153–155.

Muller, S., Raman Pandey, R., and Pillai, R.S. (2013). Les piARN forgent un système immunitaire pour le génome. *médecine/sciences* 29, 487–494.

Murley, A., Lackner, L.L., Osman, C., West, M., Voeltz, G.K., Walter, P., and Nunnari, J. (2013). ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. *ELife* 2.

Nass, M.M. (1966). The circularity of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 56, 1215–1222.

Nyathi, Y., Wilkinson, B.M., and Pool, M.R. (2013). Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 2392–2402.

Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., and Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 7743–7746.

Olichon, A., Landes, T., Arnauné-Pelloquin, L., Emorine, L.J., Mils, V., Guichet, A., Delettre, C., Hamel, C., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., et al. (2007). Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: Relevance to ADOA pathogenesis. *J. Cell. Physiol.* 211, 423–430.

Omura, T. (1998). Mitochondria-Targeting Sequence, a Multi-Role Sorting Sequence Recognized at All Steps of Protein Import into Mitochondria. *J. Biochem. (Tokyo)* 123, 1010–1016.

Osellame, L.D., Blacker, T.S., and Duchon, M.R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 711–723.

Palade, G.E. (1955). STUDIES ON THE ENDOPLASMIC RETICULUM. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 567–582.

Palmer, C.S., Osellame, L.D., Stojanovski, D., and Ryan, M.T. (2011). The regulation of mitochondrial morphology: Intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell. Signal.* 23, 1534–1545.

Paschen, S.A., and Neupert, W. (2001). Protein Import Into Mitochondria. *IUBMB Life Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life* 52, 101–112.

Pfanner, N., and Meijer, M. (1997). Mitochondrial biogenesis: The Tom and Tim machine. *Curr. Biol.* 7, R100–R103.

Phillips, M.J., and Voeltz, G.K. (2016a). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 69–82.

Phillips, M.J., and Voeltz, G.K. (2016b). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 69–82.

Pohjoismäki, J.L.O., and Goffart, S. (2011). Of circles, forks and humanity: Topological organisation and

replication of mammalian mitochondrial DNA. *BioEssays* 33, 290–299.

Poole, A.M., and Gribaldo, S. (2014). Eukaryotic Origins: How and When Was the Mitochondrion Acquired? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6.

Putney, J.W. (2005). Capacitative calcium entry. *J. Cell Biol.* 169, 381–382.

Qin, J., Guo, Y., Xue, B., Shi, P., Chen, Y., Su, Q.P., Hao, H., Zhao, S., Wu, C., Yu, L., et al. (2020). ER-mitochondria contacts promote mtDNA nucleoids active transportation via mitochondrial dynamic tubulation. *Nat. Commun.* 11.

Rajagopalan, K., Mooney, S.M., Parekh, N., Getzenberg, R.H., and Kulkarni, P. (2011). A Majority of the Cancer/Testis Antigens are Intrinsically Disordered Proteins. *J. Cell. Biochem.* 112, 3256–3267.

Reinhold, W.C., Sunshine, M., Liu, H., Varma, S., Kohn, K.W., Morris, J., Doroshow, J., and Pommier, Y. (2012). CellMiner: A Web-Based Suite of Genomic and Pharmacologic Tools to Explore Transcript and Drug Patterns in the NCI-60 Cell Line Set. *Cancer Res.* 72, 3499–3511.

Richter, C., Park, J.W., and Ames, B.N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 6465–6467.

Rieusset, J. (2018). The role of endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites in the control of glucose homeostasis: an update. *Cell Death Dis.* 9.

Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 566–578.

Roger, A.J., Muñoz-Gómez, S.A., and Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr. Biol.* 27, R1177–R1192.

Romero, P.R., Zaidi, S., Fang, Y.Y., Uversky, V.N., Radivojac, P., Oldfield, C.J., Cortese, M.S., Sickmeier, M., LeGall, T., Obradovic, Z., et al. (2006). Alternative splicing in concert with protein intrinsic disorder enables increased functional diversity in multicellular organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8390–8395.

Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., Diaz-Morales, N., Hernandez-Mijares, A., Rocha, M., and Victor, V.M. (2017). Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol.* 11, 637–645.

Rowland, A.A., and Voeltz, G.K. (2012). Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 607–625.

Saada, A. (2009). Fishing in the (deoxyribonucleotide) pool. *Biochem. J.* 422, e3–e6.

Satie, A.-P., Rajpert-De Meyts, E., Spagnoli, G.C., Henno, S., Olivo, L., Jacobsen, G.K., Rioux-Leclercq, N., Jégou, B., and Samson, M. (2002). The Cancer-Testis Gene, NY-ESO-1, Is Expressed in Normal Fetal and Adult Testes and in Spermatocytic Seminomas and Testicular Carcinoma In Situ. *Lab. Invest.* 82, 775–780.

Schwarz, D.S., and Blower, M.D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 79–94.

Sebastián, D., Hernández-Alvarez, M.I., Segalés, J., Soriano, E., Muñoz, J.P., Sala, D., Waget, A., Liesa, M., Paz, J.C., Gopalacharyulu, P., et al. (2012). Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5523–5528.

Sellitto, A., Geles, K., D’Agostino, Y., Conte, M., Alexandrova, E., Rocco, D., Nassa, G., Giurato, G., Tarallo, R., Weisz, A., et al. (2019). Molecular and Functional Characterization of the Somatic PIWIL1/piRNA Pathway in Colorectal Cancer Cells. *Cells* 8.

- Shankavaram, U.T., Varma, S., Kane, D., Sunshine, M., Chary, K.K., Reinhold, W.C., Pommier, Y., and Weinstein, J.N. (2009). CellMiner: a relational database and query tool for the NCI-60 cancer cell lines. *BMC Genomics* *10*, 277.
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W.A., Palazzo, A.F., Kozlov, M.M., and Rapoport, T.A. (2010). Mechanisms Determining the Morphology of the Peripheral ER. *Cell* *143*, 774–788.
- Shiromoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Nagamori, I., Chuma, S., Arakawa, T., Nishimura, T., Hasuwa, H., Tachibana, T., Ikawa, M., and Nakano, T. (2019). GPAT2 is required for piRNA biogenesis, transposon silencing, and maintenance of spermatogonia in mice†. *Biol. Reprod.* *101*, 248–256.
- Shoemaker, R.H. (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 813–823.
- Small, I., Peeters, N., Legeai, F., and Lurin, C. (2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *PROTEOMICS* *4*, 1581–1590.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., and Schatten, G. (2000). Ubiquitinated Sperm Mitochondria, Selective Proteolysis, and the Regulation of Mitochondrial Inheritance in Mammalian Embryos¹. *Biol. Reprod.* *63*, 582–590.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., et al. (2019). STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* *47*, D607–D613.
- Tarnowski, M., Czerewaty, M., Deskur, A., Safranow, K., Marlicz, W., Urasińska, E., Ratajczak, M.Z., and Starzyńska, T. (2016). Expression of Cancer Testis Antigens in Colorectal Cancer: New Prognostic and Therapeutic Implications. *Dis. Markers* *2016*.
- Terasaki, M., Shemesh, T., Kasthuri, N., Klemm, R.W., Schalek, R., Hayworth, K.J., Hand, A.R., Yankova, M., Huber, G., Lichtman, J.W., et al. (2013). Stacked Endoplasmic Reticulum Sheets Are Connected by Helicoidal Membrane Motifs. *Cell* *154*, 285–296.
- Theobald, D.L., Mitton-Fry, R.M., and Wuttke, D.S. (2003). NUCLEIC ACID RECOGNITION BY OB-FOLD PROTEINS. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *32*, 115–133.
- Tomiyoshi, G., Nakanishi, A., Takenaka, K., Yoshida, K., and Miki, Y. (2008). Novel BRCA2-interacting protein BJ-HCC-20A inhibits the induction of apoptosis in response to DNA damage. *Cancer Sci.* *99*, 747–754.
- Tondera, D., Santel, A., Schwarzer, R., Dames, S., Giese, K., Klippel, A., and Kaufmann, J. (2004). Knockdown of MTP18, a Novel Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Protein, Affects Mitochondrial Morphology and Induces Apoptosis. *J. Biol. Chem.* *279*, 31544–31555.
- Trotta, A.P., and Chipuk, J.E. (2017). Mitochondrial dynamics as regulators of cancer biology. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Truscott, K.N., Brandner, K., and Pfanner, N. (2003). Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr. Biol. CB* *13*, R326–337.
- Tuppen, H.A.L., Blakely, E.L., Turnbull, D.M., and Taylor, R.W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1797*, 113–128.
- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., et al. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science* *347*, 1260419–1260419.
- Van Puyenbroeck, V., and Vermeire, K. (2018). Inhibitors of protein translocation across membranes of the

secretory pathway: novel antimicrobial and anticancer agents. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 1541–1558.

Vance, J.E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* **265**, 7248–7256.

Vance, J.E. (2014a). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 595–609.

Vance, J.E. (2014b). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 595–609.

Veratti, E. (1961). INVESTIGATIONS ON THE FINE STRUCTURE OF STRIATED MUSCLE FIBER. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**, 1–59.

Vidoni, S., Zanna, C., Rugolo, M., Sarzi, E., and Lenaers, G. (2013). Why mitochondria must fuse to maintain their genome integrity. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 379–388.

Von Stockum, S., Nardin, A., Schrepfer, E., and Ziviani, E. (2016). Mitochondrial dynamics and mitophagy in Parkinson's disease: A fly point of view. *Neurobiol. Dis.* **90**, 58–67.

Wai, T., Teoli, D., and Shoubridge, E.A. (2008). The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat. Genet.* **40**, 1484–1488.

Wang, W.-X., Prajapati, P., Nelson, P.T., and Springer, J.E. (2020a). The Mitochondria-Associated ER Membranes Are Novel Subcellular Locations Enriched for Inflammatory-Responsive MicroRNAs. *Mol. Neurobiol.* **57**, 2996–3013.

Wang, X., Wen, Y., Dong, J., Cao, C., and Yuan, S. (2018). Systematic In-Depth Proteomic Analysis of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Mouse and Human Testes. *PROTEOMICS* **18**, 1700478.

Wang, X., Lv, C., Guo, Y., and Yuan, S. (2020b). Mitochondria Associated Germinal Structures in Spermatogenesis: piRNA Pathway Regulation and Beyond. *Cells* **9**, 399.

Watanabe, T., Chuma, S., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Totoki, Y., Toyoda, A., Hoki, Y., Fujiyama, A., Shibata, T., Sado, T., et al. (2011). MITOPLD Is a Mitochondrial Protein Essential for Nuage Formation and piRNA Biogenesis in the Mouse Germline. *Dev. Cell* **20**, 364–375.

Westrate, L.M., Lee, J.E., Prinz, W.A., and Voeltz, G.K. (2015). Form Follows Function: The Importance of Endoplasmic Reticulum Shape. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 791–811.

Wu, X., Cabanos, C., and Rapoport, T.A. (2019). Structure of the post-translational protein translocation machinery of the ER membrane. *Nature* **566**, 136–139.

Xing, J., Chen, M., Wood, C.G., Lin, J., Spitz, M.R., Ma, J., Amos, C.I., Shields, P.G., Benowitz, N.L., Gu, J., et al. (2008). Mitochondrial DNA Content: Its Genetic Heritability and Association With Renal Cell Carcinoma. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **100**, 1104–1112.

Yan, C., Duanmu, X., Zeng, L., Liu, B., and Song, Z. (2019). Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells* **8**.

Yanagi, T., Nagai, K., Shimizu, H., and Matsuzawa, S.-I. (2017). Melanoma antigen A12 regulates cell cycle via tumor suppressor p21 expression. *Oncotarget* **8**, 68448–68459.

Yogev, O., and Pines, O. (2011). Dual targeting of mitochondrial proteins: Mechanism, regulation and function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808**, 1012–1020.

Yu, M., Zhou, Y., Shi, Y., Ning, L., Yang, Y., Wei, X., Zhang, N., Hao, X., and Niu, R. (2007). Reduced mitochondrial

DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in Chinese breast cancer patients. *IUBMB Life* 59, 450–457.

Yuan, L., Xiao, Y., Zhou, Q., Yuan, D., Wu, B., Chen, G., and Zhou, J. (2014). Proteomic analysis reveals that MAEL, a component of nuage, interacts with stress granule proteins in cancer cells. *Oncol. Rep.* 31, 342–350.

Zamunér, F.T., Karia, B.T.R., Oliveira, C.Z. de, Santos, C.R. dos, Carvalho, A.L., and Vettore, A.L. (2015). A Comprehensive Expression Analysis of Cancer Testis Antigens in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals MAGEA3/6 as a Marker for Recurrence. *Mol. Cancer Ther.* 14, 828–834.

Zhang, A., Williamson, C.D., Wong, D.S., Bullough, M.D., Brown, K.J., Hathout, Y., and Colberg-Poley, A.M. (2011). Quantitative Proteomic Analyses of Human Cytomegalovirus-Induced Restructuring of Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Contacts at Late Times of Infection. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 10.

Zhao, H., Pan, W.-M., Zhang, H.-H., Song, Y., Chen, J., Xiang, Y., Gu, B., Li, S.-Z., Du, R.-L., and Zhang, X.-D. (2019). Cancer testis antigen 55 deficiency attenuates colitis-associated colorectal cancer by inhibiting NF- κ B signaling. *Cell Death Dis.* 10.

Zimmermann, R., Eyrich, S., Ahmad, M., and Helms, V. (2011). Protein translocation across the ER membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 912–924.

Titre : Identification et caractérisation d'un *Cancer/Testis Antigen* mitochondrial : CT55

Mots clés : Cancer/Testis Antigène, mitochondrie, cancer, spermatogenèse, CT55

Résumé : Les mitochondries sont des organites essentiels qui possèdent leur propre génome, l'ADN mitochondrial (ADNmt), présent en centaines voire milliers de copies par cellule. La régulation de l'abondance de ce génome représente un enjeu important pour la cellule, dont les dysfonctions sont responsables de pathologies héréditaires et communes, dont le cancer. Les acteurs impliqués dans la réplication de l'ADNmt ainsi que des facteurs nucléaires impliqués dans la biogénèse de l'ADNmt sont connus, mais les régulateurs de son abondance demeurent inconnus. Dans la perspective d'identifier de nouveaux régulateurs contrôlant le nombre de copie de l'ADNmt, une analyse de la base de données NCI-60 a permis d'identifier un nouveau gène très peu décrit dont l'expression est corrélée à la quantité d'ADNmt: *CT55*, un membre de la famille des *Cancer/Testis Antigen* (CTA). Cette famille composée de 276 gènes présente un profil d'expression physiologique restreint au testicule et pathologique dans les cancers. Au sein de cette famille, nous avons répertorié cinq CTA

mitochondriaux et 67 potentiellement adressés à la mitochondrie, dont CT55. Notre approche expérimentale a montré que CT55 est localisé à la mitochondrie et au réticulum endoplasmique via une séquence d'adressage ambiguë et que son expression est effectivement positivement corrélée au nombre de copies d'ADNmt. Nous montrons par ailleurs que CT55 est indispensable à la prolifération cellulaire et que son absence induit des modifications transcriptionnelles en lien avec l'arrêt du cycle cellulaire. Enfin, l'expression de CT55 est corrélée à 51 autres CTAs, et représente un marqueur de diagnostic péjoratif pour les patients exprimant cette protéine dans leur tumeur. Finalement, l'analyse de la séquence protéique de CT55 et son homologie avec une RNA-hélicase suggère que CT55 régule des piARNs requis pour la spermatogenèse et la tumorigénèse. Donc CT55, de part ses propriétés que nous avons identifiées, représente une cible de choix pour l'immunothérapie des cancers.

Title : Identification and characterization of a mitochondrial *Cancer/Testis Antigen* : CT55

Keywords : Cancer/Testis Antigen, mitochondrion, cancer, spermatogenesis, CT55

Abstract : Mitochondria are essential organelles that have their own genome, the mitochondrial DNA (mtDNA), which is present in hundreds to thousands of copies per cell. The regulation of the abundance of this genome represents an important issue for cells, whose dysfunctions are responsible for hereditary and common pathologies, including cancers. The actors involved in mtDNA replication, as well as the nuclear factors involved in mtDNA biogenesis are known, but the regulators of its abundance remain unknown. In order to identify new actors controlling the number of mtDNA copies, an analysis of the NCI-60 database identified a new gene that is poorly described and whose expression is correlated with the amount of mtDNA: *CT55*, a member of the *Cancer/Testis Antigen* (CTA) family. This family of 276 genes has a physiological expression profile restricted to the testicle and a pathological one in many cancers. Among this family, we identified 5

mitochondrial CTAs and 67 potentially addressed to the mitochondria, among which CT55. Our experimental approach disclosed that CT55 colocalizes to the mitochondria and the endoplasmic reticulum, due to the presence of a ambiguous targeting sequence, and that its expression effectively correlates positively to the mtDNA copy number. We further showed that CT55 is essential to cell proliferation and that its absence induces transcriptional modifications in relation to the inhibition of the cell cycle. Finally, CT55 expression is correlated with that of 51 other CTAs and represents a pejorative diagnostic marker for patients expressing this protein in their tumour. Ultimately, analysis of CT55 protein sequence and its homology with an RNA-helicase suggest that CT55 regulates piARNs required for spermatogenesis and tumorigenesis. Thus CT55, because of its properties that we have identified, represents a promising target for cancer immunotherapy.