



HAL
open science

La survie et les adaptations métaboliques des cellules primitives mésenchymateuses et hématopoïétiques en anoxie et anoxie/aglycémie

Alice Refeyton

► **To cite this version:**

Alice Refeyton. La survie et les adaptations métaboliques des cellules primitives mésenchymateuses et hématopoïétiques en anoxie et anoxie/aglycémie. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0028 . tel-04636858

HAL Id: tel-04636858

<https://theses.hal.science/tel-04636858>

Submitted on 5 Jul 2024

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par **Alice REFAYTON**

**LA SURVIE ET LES ADAPTATIONS MÉTABOLIQUES DES CELLULES PRIMITIVES MESENCHYMATEUSES
ET HÉMATOPOÏÉTIQUES EN ANOXIE ET ANOXIE/AGLYCÉMIE**

Sous la direction de : Mme. Marija Vlaski-Lafarge, CR EFS, U1211

Soutenue le 29 Février 2024

Membres du jury :

M. MOURIER Arnaud,	DR, UMR 5095, IBGC, Bordeaux	Président/Examineur
M. PAGES, Jean-Christophe	PU-PH, UMR 5070, RESTORE, Université de Toulouse – Paul Sabatier	Rapporteur
Mme JAUKOVIĆ, Aleksandra	DR, Institute for Medical Research, Belgrade	Rapporteuse
M. DELLO SBARBA, Persio	PU, Università degli Studi, Firenze	Examineur
M FILIPOVIĆ, Milos	DR, ISAS, Dortmund	Invité
Mme BOEUF, Hélène	Dr, U1026, Biotis, Bordeaux	Invité
Mme. Marija Vlaski-Lafarge	CR, U1211, EFS, Bordeaux	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Mes sincères remerciements,

A tous les membres de mon jury, pour votre présence et le temps que vous avez pris pour évaluer mon travail. Un merci particulier à mes rapporteurs, M. PAGES Jean-Christophe et Mme JAUKOVIC Aleksandra, pour avoir analysé, corrigé et jugé ce manuscrit qui aura, je l'espère, su vous convaincre sur le plan scientifique. M. MOURIER Arnaud et M. DELLO SBARBA Persio, mes examinateurs pour leur écoute attentive et leurs questions pertinentes qui ont su me guider tout au long de cette thèse, faisant également partie de mon jury de mi-thèse. A mon jury invité, M FILIPOVIC Milos et Mme BOEUF Hélène, pour les projets partagés, ainsi que les échanges tout au long de ma thèse. Je suis honorée que vous soyez tous présents aujourd'hui dans ce qui va être, je l'espère, le premier jour du reste de ma vie professionnelle.

Mes sincères remerciements,

A M. IVANOVIC Zoran, pour sa confiance par deux fois en mes capacités, pour nos réunions de travail dans lesquelles j'ai beaucoup appris, pour les discussions sur la manière dont sont nées nos chères cellules, et surtout pour les surnoms donnés à l'ensemble de mes chaussures.

Mes sincères remerciements,

A toute l'équipe de l'EFS. Ce serait très long de faire des remerciements à chacun d'entre vous mais j'ai appris et passé d'excellents moments avec chacun d'entre vous. J'ai appris à découvrir ou redécouvrir des personnes incroyables. Merci pour ces 3 années de votre soutien sans faille, autant sur le plan scientifique que personnel. Pascale, pour ses idées voyages, ses mixeds de salades, et son organisation qui m'ont permis de me sortir de plusieurs situations périlleuses. Laura, pour nos discussions pop culture, disney, nos sushis, nos dessins et ne t'inquiète pas, je suis sur celui des plans de ta future maison quand tu n'auras plus de place dans la tienne. Philippe, pour m'avoir adoptée dans « l'autre TEAM » (même si je ne sais pas si tu as eu vraiment le choix), pour tes playlists parce que le rock c'est quand même la meilleure des musiques, et pour m'avoir appris les meilleurs pas de danse au CHO. Christelle, pour toutes nos discussions, scientifiques mais surtout les autres, je suis très heureuse de t'avoir vu enfin intégrer le laboratoire définitivement car tu le mérites amplement. Maryse, pour être un peu le soleil de ma journée, nos OLA du matin, les musiques au laboratoire, nos sessions de commérages et de m'avoir fait rire plus que personne, surtout quand toi, tu ris. J'en profite pour dire merci à tous les stagiaires que j'ai pu croiser et vous dire un grand bravo pour m'avoir supportée. Un deuxième merci spécial à Maryse et Laura pour la relecture de cette thèse.

Mes sincères remerciements,

A toutes les personnes qui ont joué un rôle dans cette thèse par leur aide précieuse dans les expériences ou par leur conseil. Mr PINSON Benoit, Mme AMOEDO Nivéa, Mr VILLACRECES Arnaud et bien sur mes jury invités Mme me BOEUF Hélène et M FILIPOVIC Milos.

Mes sincères remerciements,

A toi Mathilde, bien sûr. Tu n'es actuellement plus dans le laboratoire, parce que toi tu es docteur je crois déjà. Mais bon, comme je suis invitée au mariage, et que les mariages c'est génial, je vais quand même te faire un petit paragraphe spécial. Un an de rien, de peur (tu es terrorisante), mais on a su se rattraper comme il se doit. A nos journées au laboratoire à avoir soif, a nos matchs de badminton (un jour je te laisserai gagner), à nos descentes de pistes, mais pas que (Kilkenny ou flo ?), à ton auto-médication, mais surtout à notre amitié. Tu es coincée, fallait tenir un an de plus sans me parler, et puis pour le mot de la fin tu sais que « ce genre d'amitié, c'est pour la vie ».

Mes sincères remerciements,

A toi Chrislaure. Normalement on n'est pas sencé avoir de préférence, mais des remerciements de thèse, on n'en écrit qu'une seule fois. Alors merci à toi, tu as fait de 6 mois de mes trois ans de thèse, un vrai bonheur. Il y a des gens qui sont tout simplement bienveillants et solaires. A vaïana, à nos bubble tea, nos cinés et tes chocolats viennois au bar. En espérant un jour pouvoir venir visiter ta famille à l'autre bout du monde.

Mes sincères remerciements,

A Véronique LABAT. Un énorme merci à toi Véronique, sans qui la majorité des travaux de cette thèse n'auraient pas vu le jour. Merci pour ta patience et le temps que tu as pris pour mettre au point et m'aider sur toutes les « manip ». J'ai pu grandement me reposer sur toi et cela m'a permis de relacher cette pression supplémentaire, surtout sur la fin de la thèse. Merci pour tes corrections de dernière minute et merci surtout de t'être levée avec moi à des heures qui, ne nous mentons pas, ne sont pas nos heures de prédilection. GO TEAM.

Mes sincères remerciements,

A Marija VLASKI-LAFARGE. Ma directrice de thèse. Merci d'avoir « misé » sur moi une seconde fois. C'est peut-être le plus difficile quand on m'a déjà encadrée une fois. Merci d'avoir donné autant pour ce projet, pour moi. Je suis revenue, deux ans après le master, toujours aussi têtue et tu as fais de moi une scientifique apte à affronter les plus grands. J'ai énormément appris et grandi avec tes conseils. Tu m'as poussé à voir plus loin, à m'imposer quand peut être je ne l'osais pas. J'en ai joué des matchs mais on peut dire que celui-ci était le plus dur et le plus beau. Merci COACH. Le chemin est long dans une carrière, mais je me sens armée sicientifiquement et mentalement. Alors, vraiment, од срца хвала.

Mes sincères remerciements,

A tous mes amis qui m'ont soutenue. A coralie, pour, il y a 23 ans s'être assise à côté de moi à un entraînement de handball et maintenant tu as fait de moi la marraine la plus heureuse du monde. A Chacha, ma supportrice numéro 1 ; Aux pupuces, pour nos verres aux caves ; A Sarah, ma binome scientifique et amie. A Léa, pour être tout simplement là depuis maintenant plus de 10 ans et bientôt à l'autre bout du monde. A Claire, pour être celle qui m'a poussée à ne jamais lâcher. Et enfin à tous les gens que j'ai pu apprendre à connaître pendant ses trois années avec une mention spéciale à tous mes amis parisiens qui ne savent plus si j'habite à Bordeaux ou à Paris.

Mes sincères remerciements,

A mes deux colocataires, Mathilde et Oscar mon cousin. Vous m'avez supportée durant cette thèse plus que personne. Merci pour ces deux ans de colocation, je n'aurais pas pu rêver mieux.

Mes sincères remerciements,

A toute ma famille REFEYTON et BERNARD-CHEVASSUS-MASIA. Peut être le plus important. Mes oncles, mes tantes, mes cousins, cousines. Merci a mes grands-parents, Papi, Mami, Pierro et Grany. J'ai la chance de vous avoir eu à mes côtés jusqu'à ce moment décisif de ma vie. Je suis très fière d'être votre petite fille et j'espère que vous êtes fiers de moi.

Mes sincères remerciements,

A ma sœur et mon frère. 28 et 24 ans qu'on avance ensemble. Mais je peux dire que c'est certainement aujourd'hui que nous avons trouvé notre meilleur équilibre. Etre grande sœur ce n'est pas toujours facile à ce qu'on dit, pas avec vous. Merci pour nos week-ends, nos fous rires, nos quilles. Merci d'être mes piliers, mes meilleurs amis. Sans vous et votre soutien je ne serais sûrement pas allé aussi loin, mais surtout la vie serait triste. Merci de faire de mon histoire la meilleure des aventures.

Mes sincères remerciements,

A mes parents. Oui, pour finir, merci aux deux personnes sans qui tout ceci ne serait pas possible. Merci de m'avoir soutenue depuis maintenant 30 ans. Merci de m'avoir éduquée dans l'amour, le respect et le travail. Merci d'avoir cru en moi et respecté mes choix, même si la plupart du temps je les faisais pour vous. Le choix de cette thèse, je l'ai fait pour moi, alors j'espère que vous êtes très fiers de votre grande fille parce que, pour une fois, moi je le suis. Merci du fond du cœur.

A Jean-Luc et Lionel. A Pierro

Résumé :

Les cellules stromales mésenchymateuses (CStrom) comprennent des cellules souches mésenchymateuses (CSM) multipotentes capables de régénérer des tissus lésés par des agressions de type ischémique. Pourtant, une mortalité élevée des CStrom après transplantation est mise en évidence lors de leur prise de greffe. Par conséquent, explorer les stratégies visant à améliorer la viabilité des greffes cellulaires constitue le défi de la thérapie cellulaire. À cette fin, nous avons effectué des analyses fonctionnelles et métaboliques sur deux types de population différents contenant des CS somatiques : des CStrom et une population de cellules partenaire de la niche hématopoïétique, les CD34⁺, qui comprend des cellules souches hématopoïétiques (HSC).

Les CStrom et cellules CD34⁺ ont été cultivées dans différentes conditions, condition d'anoxie (absence d'O₂), condition de type ischémique (anoxie/aglycémie, absence d'O₂ et de glucose, AA) ou à 3% d'O₂ correspondant à la concentration physiologique optimale, puis analysées.

Les tests fonctionnels révèlent que les CStrom et les cellules CD34⁺ présentent des propriétés de prolifération et de différenciation complètes en anoxie. Les analyses fonctionnelles de cellules individuelles et d'expression génique ont révélé que les CStrom et CD34⁺ sont non seulement maintenues dans un environnement d'AA, mais sont celles dans lesquelles les CS, ayant la capacité de prolifération et de différenciation la plus élevée, sont les plus enrichies. L'analyse métabolique multiparamétrique montre que la survie en anoxie est principalement soutenue par la glycolyse et le métabolisme des lipides. En revanche, l'homéostasie énergétique des CStrom dans la condition AA est partiellement assurée par l'activité mitochondriale anaérobie engageant particulièrement les complexes mitochondriaux I, III et l'ubiquinone. De plus une accumulation importante de succinate dans cette condition, pour les deux types de CS, a été mise en évidence. Ceci est dû en partie à une inversion de la succinate déshydrogénase, qui à son tour est entraînée par le débordement de fumarate provenant de la dégradation des nucléotides puriques et par une activité de navette malate-aspartate. Cependant, les principales voies contribuant à l'accumulation de succinate comprennent la stimulation de la glycolyse induite par le glycogène, ainsi que le métabolisme du corps cétonique, des acides aminés gras et du propanoate qui fournissent du succinate converti en succinyl-CoA dans la réaction générée par l'énergie au niveau du substrat. De plus, la survie à l'ischémie des CStrom est liée au métabolisme des sulfures ainsi qu'à la consommation de H₂S et à une survie améliorée en présence des donneurs de H₂S. De plus, l'oxydation du H₂S médiée par la sulfide Quinone OxidoReductase (SQOR) entraîne le transport réverse des électrons au niveau du complexe mitochondrial I, en utilisant le glutathion comme accepteur d'électrons. L'analyse de l'utilisation des substrats énergétiques a montré que les cellules CD34⁺ en anoxie semblent utiliser majoritairement les sucres simples afin d'alimenter la voie glycolytique et une diminution consécutive du métabolisme mitochondrial en

comparaison à la condition à 3% d'O₂. En revanche, en AA, les intermédiaires du cycle de Krebs sont utilisés de manière intensive pour effectuer la réaction d'oxydoréduction des coenzymes NAD/NADH. Nos résultats révèlent une grande flexibilité métabolique de la population cellulaire CStroM et CD34⁺ s'appuyant sur l'enrichissement en CS somatiques détecté en anoxie ou dans la condition d'AA. Ainsi, à la différence des cellules différenciées, les CS somatiques (CSM et CSH) ont la capacité de survivre dans des conditions d'AA en utilisant les voies énergétiques conservatrices évolutives existant chez les premiers eucaryotes dans des zones anoxiques, enrichies en sulfide. L'exploitation de ce conditionnement ex vivo dans des conditions imitant l'ischémie pourrait constituer une stratégie visant à améliorer la survie des CStroM implantées dans des tissus hypoxiques/ischémiques.

Mots clés : Cellules souches – Cellules stromales mésenchymateuses – cellules CD34⁺ hématopoïétiques – métabolisme – Anoxie – Ischémie.

Abstract :

Mesenchymal stromal cells (MStroC) comprise Mesenchymal Stem Cells (MSC) capable of regenerating tissues damaged by ischemic insults. However, high mortality of MStroC after transplantation is highlighted during their engraftment. Therefore, exploring strategies to improve the viability of cell grafts constitutes the challenge of cell therapy. To this end, we performed functional and metabolic analyzes on two different types of populations containing somatic SC: MStroC and a population of hematopoietic niche partner cells, CD34⁺, which include the hematopoietic stem cells (HSC).

MStroC or CD34⁺ cells were cultured under conditions of anoxia (absence of O₂) and ischemia-like (anoxia/aglycemia, absence of O₂ and glucose, AA) or at 3% O₂ corresponding to the optimal physiological concentration and then analyzed.

Functional assays reveal that MStroC and CD34⁺ cells exhibit complete proliferation and differentiation properties in anoxia. Functional analyzes of single cells and gene expression revealed that MStroC and CD34⁺ are not only maintained in an AA state, but are those in which SC, having the highest proliferation and differentiation capacity, are the most enriched. Multiparametric metabolic analysis shows that survival in anoxia is mainly supported by glycolysis and lipid metabolism. On the other hand, the energy homeostasis of MStroC in the AA condition is partially ensured by anaerobic mitochondrial activity particularly involving mitochondrial complexes I, III and ubiquinone. In addition, a significant accumulation of succinate in this condition for both types of SC was demonstrated. This is due in part to an inversion of succinate dehydrogenase, which in turn is driven by fumarate spillover from purine nucleotide degradation and malate-aspartate shuttling activity. However, major pathways contributing to succinate accumulation include glycogen-induced glycolysis stimulation, as well as metabolism of ketone body, fatty amino acids, and propanoate which provide succinate converted to succinyl-CoA into the reaction generated by energy at the substrate level. Furthermore, MStroC ischemia survival is linked to sulfide metabolism as well as H₂S consumption and improved survival in the presence of H₂S donors. Additionally, H₂S oxidation mediated by Sulfide Quinone OxidoReductase (SQOR) results in reverse electron transport at mitochondrial complex I, using glutathione as an electron acceptor. The analysis of the use of energy substrates showed that CD34⁺ cells in anoxia seem to mainly use simple sugars in order to fuel the glycolytic pathway and a consequent reduction in mitochondrial metabolism compared to the 3% O₂ condition. In contrast, in AA, Krebs cycle intermediates are used intensively to carry out the redox reaction of coenzymes NAD/NADH.

Our results reveal a great metabolic flexibility of the MStroC and CD34⁺ cell populations based on the enrichment of somatic SC detected in anoxia or in the condition mimicking ischemia. Thus, unlike differentiated cells, the somatic SC (MSC and HSC) have the capacity to survive in AA by using the evolutionary conservative energy pathways existing in the first eukaryotes enriched in sulfides and

living in anoxic zones. Exploiting this *ex vivo* conditioning under AA could constitute a strategy to improve the survival of MStroM implanted in hypoxic/ischemic tissues.

Keywords: Stem cells – Mesenchymal stromal cells – Hematopoietic – metabolic CD34+ cells – Anoxia – Ischemia.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	12
TABLE DES FIGURES	17
TABLE DES ABREVIATIONS	19
INTRODUCTION	23
CHAPITRE 1 : LES CELLULES SOUCHES	23
1. ETABLISSEMENT DES CELLULES SOUCHES : DU MYTHE A L'ENTITE SPECIFIQUE.....	23
1.1. La quête de l'immortalité	23
1.2. Origine et étude pionnière du concept des cellules souches	24
2. L'ENTITE CELLULES SOUCHES	29
2.1. Définition des cellules souches	29
2.2. Classification des cellules souches.....	30
2.2.1 Les cellules souches totipotentes.....	30
2.2.2. Les cellules souches pluripotentes	30
2.2.3. Les cellules souches multipotentes	31
2.2.4. Les cellules souches pluripotentes induites (iPS)	32
2.2.5. Les cellules souches cancéreuses (CSC)	32
3. LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES ET LES CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES	33
3.1. Les cellules souches mésenchymateuses.....	33
3.1.1. Classification des cellules stromales mésenchymateuses et des cellules souches	
mésenchymateuses.....	33
3.1.2. Critères d'identification des cellules stromales mésenchymateuses	34
3.1.3. Rôle physiologique des cellules stromales mésenchymateuses.....	36
3.2. Les cellules souches hématopoïétiques	41
3.2.1. Classification	41
3.2.2. L'hématopoïèse	42
3.2.3. Phénotype des CSH.....	45
4. LA NICHE HEMATOPOIETIQUE : MICROENVIRONNEMENT DES CSH ET CStrom DANS LA MOELLE	
OSSEUSE	45
CHAPITRE 2 : METABOLISME BIOENERGETIQUE CHEZ L'HOMME	48
1. Le métabolisme anaérobie	48
1.1. La glycolyse	48
1.1.1. Description de la voie.....	48

1.1.2.	La régulation de la glycolyse.....	51
1.2.	La fermentation lactique	53
1.3.	La voie des pentoses phosphates (PP)	55
1.4.	La néoglucogenèse	56
1.5.	Autres voies cytosoliques non dépendantes de l'O ₂	58
2.	Le métabolisme aérobie.....	58
2.1.	La mitochondrie	58
2.2.	Le cycle de Krebs.....	60
2.3.	La chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) et les oxydations phosphorylantes	62
2.3.1.	La théorie chimio-osmotique de Mitchell	62
2.3.2.	La composition protéique des oxydations phosphorylantes	63
2.3.3.	Le transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire et la production d'ATP.....	65
2.4.	Les principales voies alimentant la mitochondrie pour faire fonctionner le cycle de Krebs et les oxydations phosphorylantes	66
2.4.1.	La β-oxydation	67
2.4.2.	La glutaminolyse	68
2.4.3.	La dégradation des acides aminés.....	69
2.5.	Autres enzymes impliquées dans l'apport d'électrons à la chaîne respiratoire.....	70
3.	Le métabolisme du H ₂ S, substrat inorganique donneur d'électrons.....	71
3.1.	L'oxydation du H ₂ S.....	71
3.2.	Les enzymes impliquées dans la formation et l'utilisation du H ₂ S.....	72
3.2.1.	Sulfide quinone oxidoreductase (SQR)	72
3.2.2.	persulfide dioxygénase (ETHE1).....	72
3.2.3.	Thiosulfate sulfurtransferase (TST).....	72
3.2.4.	Sulfite oxidase (SUOX).....	73
3.3.	Les différentes étapes d'oxydation par le H ₂ S.....	73
4.	Voie anaérobie mitochondriale.....	75
CHAPITRE 3 : EVOLUTION, OXYGENATION ET METABOLISME CELLULAIRE		78
1.	APPARITION DE L'OXYGENE SUR TERRE ET EVOLUTION DES ORGANISMES EUCARYOTES	78
1.1.	Environnement terrestre au moment du développement des premiers organismes	78
1.2.	Le métabolisme bioénergétique des premiers organismes apparus sur terre.....	79
1.3.	Le grand événement d'oxygénation (GEO)	80
1.4.	L'apparition des premiers eucaryotes.....	81
1.4.1.	La théorie endosymbiotique	81
1.4.2.	Les premiers eucaryotes sont des organismes anaérobies	82
1.4.3.	La cohabitation entre les organismes anaérobies et aérobie.....	83

1.5. Le développement des eucaryotes complexes et la mise en place de l'oxygénation terrestre contemporaine	84
2. LES NICHES DES CELLULES SOUCHES SONT UNE REMINESCENCE DES MICROENVIRONNEMENTS DANS LESQUELS SE SONT DEVELOPPES LES PREMIERES CELLULES EUCARYOTES	84
3.1. L'oxygénation <i>in situ</i> physiologique chez l'homme	84
3.1. L'oxygénation de la niche des cellules souches hématopoïétiques et stromales mésenchymateuses	86
3.1. L'oxygénation est un facteur de régulation des cellules souches hématopoïétiques et des cellules stromales mésenchymateuses	87
3. LE PROFIL BIOENERGETIQUE DES CELLULES SOUCHES ADULTES	89
3.1. Les voies métaboliques utilisées par les cellules souches adultes	89
3.2. Le facteur HIF : régulateur du métabolisme des cellules souches dans la niche à basse concentration en O ₂	91
3.2.1. La structure de HIF	91
3.2.2. La régulation des facteurs HIF	92
3.3. La régulation du métabolisme des cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques	94
CHAPITRE 4 : METABOLISME CELLULAIRE EN ANOXIE ET ISCHEMIE	96
1. DEFINITION	96
2. ETAT SYSTEMIQUE DE L'ANOXIE ET DE L'ISCHEMIE	96
2.1. Les dérégulations ioniques	97
2.2. Déclenchement de la mort cellulaire	98
2.3. Les dérégulations du métabolisme cellulaire	100
2.3.1. Les changements glycolytiques	100
2.3.2. Les changements au niveau du métabolisme des acides gras et de la β-oxydation ..	101
2.3.3. Les changements au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale	102
3. Le succinate, marqueur de l'ischémie	103
4. LES ADAPTATIONS METABOLIQUES A L'ANOXIE ET L'ISCHEMIE	105
4.1. Les stratégies d'adaptations métaboliques des organismes à l'anoxie	105
4.1.1. Les stratégies d'adaptations métaboliques des organismes anaérobies	105
4.1.2. Les stratégies d'adaptations métaboliques des organismes aérobies	106
4.2. Les stratégies d'adaptations métaboliques en ischémie	108
CHAPITRE 5 : THERAPIE CELLULAIRE : UTILISATION DE CELLULES SOUCHES	109
1. LA GREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUE	109
2. LA GREFFE DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES	110
3. LA CULTURE DE CELLULES SOUCHES <i>EX VIVO</i>	111
OBJECTIFS	113

MATERIELS ET METHODES	115
1. Culture cellulaire et préparation des cellules	115
1.1. Récupération et amplification des CStrom	115
1.2. Récupération des cellules CD34 ⁺ d'unité de sang placentaire.....	116
1.3. Culture des CStrom et CSH dans les conditions expérimentales d'Anoxie/Aglycémie (AA), Anoxie (ANO) et la condition contrôle à 3% d'O ₂	116
1.3.1. Les milieux de culture	116
1.3.2. La mise en place des différentes conditions d'oxygénation	117
2. Préparation des culots secs et des extraits protéiques	118
3.1. Culots secs	118
3.1. Extraits protéiques	118
3. Analyses fonctionnelles.....	118
3.1. Analyse de la mort cellulaire, apoptose/nécrose	118
3.2. Test clonogénique "Colony-forming cell" (CFC)	119
3.3. Co-culture de CStrom et des cellules CD34 ⁺	120
3.4. Analyse du cycle cellulaire	121
3.5. Analyse « single-cell »	122
3.5.1. Capacité de prolifération (Figure 31A)	122
3.5.2. Capacité de différenciation/multipotence (Figure 31B)	122
4. Analyse des gènes de primitivité	123
5. Analyse du profil bioénergétique des CS	126
5.1. Masse mitochondriale.....	126
5.1.1. Détermination de la masse mitochondriale en utilisant le MitoTracker green.....	126
5.1.2. Détermination de la masse mitochondriale en utilisant le marqueur anti-TOM20 ...	126
5.2. Activité mitochondriale.....	127
5.3. Contenu en ATP	127
5.4. NADH/NAD ratio.....	128
5.5. Contenu en lactate	128
5.6. Mesure de l'activité métabolique	129
5.6.1. Analyse de la respiration cellulaire en utilisant l'oxygraphe OROBOROS	129
5.6.2. Analyse bioénergétique en utilisant la technologie du Seahorse	130
Quantification du taux de glutathion réduit et oxydé	132
5.7.1. Analyse de la quantité de glutathion de Cstrom issus de culture en AA, ANO et à 3% d'O ₂	132
5.7.2. Analyse de la quantité de glutathion de cellules CD34 ⁺ issus de culture en AA, ANO et à 3% d'O ₂	132
6. Analyse du profil métabolique des CS.....	133

6.1.	Analyses transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques	133
6.1.1.	Analyse du transcriptome	133
6.1.2.	Analyse du protéome	133
6.1.3.	Analyse du métabolome	133
6.2.	Analyse du Contenu en succinate	133
6.3.	Analyses du contenu en H ₂ S.....	134
6.3.1.	Contenu cellulaire en H ₂ S	134
6.3.2.	Contenu en H ₂ S de la culture.....	134
6.4.	Analyse de la quantité de protéine par Western Blot	134
6.5.	Analyses de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale	135
6.6.	Analyses de la consommation de substrats énergétiques par la technologie Omniolog ...	135
6.6.1.	Mitoplate S-1.....	137
6.6.2.	Plaque PM-M1.....	137
6.6.3.	Scellement et lecture des plaques.....	138
RESULTATS	139
MAINTENANCE ET SURVIE DES CStrom DE MO EN CONDITION MIMANT L'ISCHEMIE (AA), EN ANOXIE ET A 3% D'O ₂		139
PROFIL BIOENERGETIQUE DES CStrom DE MO EN CONDITION MIMANT L'ISCHEMIE (AA), EN ANOXIE ET A 3% D'O ₂		146
ANALYSES APPRONFONDIES DES ANALYSES OMICS DES CStrom DE MO EN CONDITION MIMANT L'ISCHEMIE (AA), EN ANOXIE ET A 3% D'O ₂		165
IMPLICATION DU METABOLISME DES SULFIDES DANS DES CStrom DE MO EN CONDITION MIMANT L'ISCHEMIE (AA), EN ANOXIE ET A 3% D'O ₂		171
METABOLISME DES CD34 ⁺ DE MO EN CONDITION MIMANT L'ISCHEMIE (AA), EN ANOXIE ET A 3% D'O ₂		174
DISCUSSION		187
CONCLUSION		203
ANNEXES		205
CONTRIBUTIONS A D'AUTRES PROJETS DE RECHERCHES		223
BIBLIOGRAPHIE		224

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Représentation de la régénération cellulaire dans l'histoire.	23
Figure 2. Diagramme de Valentin Häcker de 1892 de la cellule souche dans l'embryon de Cyclope... ..	24
Figure 3. Schéma représentant le point de vue d'Artur Pappenheim sur l'hématopoïèse de 1905.. ..	25
Figure 4. Représentation schématique des transplantations sériées de James Till et Ernest McCulloch.....	27
Figure 5. Schéma représentant la recherche expérimentale sur les CS du tissu conjonctif dérivées de la MO, qui ont ensuite été appelées « cellules souches mésenchymateuses ».	28
Figure 6. Représentation schématique des différents modes de divisions des CS.....	30
Figure 7. Approche d'évaluation de la capacité de prolifération et de différenciation unicellulaire de la population de CStroM totale.	35
Figure 8. Représentation schématique de l'hématopoïèse.	43
Figure 9. Schéma de la composition de la niche hématopoïétique de la moelle osseuse.	47
Figure 10. Schéma de la glycolyse.....	50
Figure 11. Schéma simplifié de la glycolyse et de ses voies interconnectées.....	53
Figure 12. Schéma de la fermentation lactique ou glycolyse anaérobie à partir du schéma de la glycolyse simplifiée.....	54
Figure 13. Schéma de la voie des PP.....	55
Figure 14. Schéma de la néoglucogénèse.....	57
Figure 15. Schéma de la structure mitochondriale	59
Figure 16. Schéma du cycle de Krebs.....	61
Figure 17. Schéma des OXPHOS	66
Figure 18. Schéma de la β -oxydation des AG.	67
Figure 19. Schéma simplifié de la glutaminolyse.	69
Figure 20. Schéma du métabolisme du H_2S	74
Figure 21. Condition environnementale primitive de la terre lors de l'émergence de la vie	79
Figure 22. Schéma récapitulation du gradient d'oxygène <i>in vivo</i> chez l'homme.	85
Figure 23. Schéma de la structure du domaine des différentes sous unités HIF (HIF-1 α ; HIF2 α , HIF-3 α et HIF-1 β) humaines.....	92
Figure 24. Schéma de la régulation de la protéine HIF-1 α	93
Figure 25. Schéma des dérégulations ioniques lié aux atteintes cellulaires ischémiques	97
Figure 26. Schéma des différentes formes de mort cellulaire lié aux atteintes ischémiques.	100
Figure 27. Schéma des conséquences métaboliques de l'ischémie	102
Figure 28. Image de prélèvement de cellules.....	115
Figure 29. Chambre d'anoxie.....	117
Figure 30. Colonies observées par le test de Colony Forming Cells (CFC).....	120
Figure 31. Représentation schématique du test d'évaluation de la capacité de prolifération et de différenciation d'une cellule individuelle.....	123
Figure 32. Schéma du déroulement de la qPCR.....	125
Figure 33. Plan de la plaque Mitoplate (S1).	136
Figure 34. Plan de la plaque phenotype (PM-M1).....	136
Figure 35. Prolifération et expansion des CStroM de MO en AA, ANO et à 3% d'O ₂	139
Figure 36. Analyse de la distribution des phases du cycle cellulaire des CStroM de MO en AA, ANO et à 3% d'O ₂	140
Figure 37. Analyse de l'apoptose après 7 jours de culture des CStroM de MO en AA, ANO et à 3% d'O ₂	141
Figure 38. Analyse du potentiel d'expansion des CStroM pré-incubées en AA, en ANO et à 3% d'O ₂ pendant 7 jours (PC) puis remise en culture (JO) pendant 11 jours à 3% d'O ₂	142
Figure 39. Analyse du potentiel prolifératif et clonogénique des CStroM en AA, ANO et à 3% d'O ₂ ..	144

Figure 40. Analyse de l'expression des gènes de primitivité des CS sur une population de CStrom incubée en AA, ANO et à 3% d'O ₂ pendant 7 jours.....	144
Figure 41. Analyse de l'impact de la co-culture entre CStrom et CD34 ⁺ sur la production de progéniteurs engagés à partir de pré-CFC.....	146
Figure 42. Analyse du contenu et de l'activité mitochondriale de CStrom en AA, ANO et à 3% d'O ₂	147
Figure 43. Détermination de l'activité mitochondriale par mesure de leur affinité pour l'oxygène en AA, ANO et à 3% d'O ₂	148
Figure 44. Profil bioénergétique des CStrom incubées pendant 5-7 jours en AA, ANO et à 3% d'O ₂	149
Figure 45. Quantité de lactate des CStrom incubées pendant 5-7 jours en AA, ANO et à 3% d'O ₂	150
Figure 46. Analyses protéomiques des CStrom incubées pendant 5-7 jours en ANO et à 3% d'O ₂	155
Figure 47. Analyses protéomiques des CStrom incubées pendant 5-7 jours en AA et à 3% d'O ₂	159
Figure 48. Analyses protéomiques des CStrom incubés pendant 5-7 jours en AA et en ANO.....	164
Figure 49. Analyses métabolomiques des CStrom incubés pendant 5-7 jours en AA, ANO et à 3% d'O ₂	164
Figure 50. Quantité de succinate de CStrom incubées pendant 5 jours en AA, ANO et à 3% d'O ₂	165
Figure 51. Prolifération, pourcentage d'inhibition de l'ATP et intensité de fluorescence du TMRM des CStrom de MO en AA, ANO et à 3% d'O ₂ incubées pendant 4-5 jours en présence d'inhibiteurs métaboliques spécifiques.....	168
Figure 52. Détermination de l'activité du CI de la CRM de CStrom incubées en AA, ANO et à 3% d'O ₂	169
Figure 53. Analyse du rapport NAD ⁺ /NADH de CStrom incubées en AA, ANO et à 3% d'O ₂	170
Figure 54. Analyse de l'implication du métabolisme du H ₂ S dans les CStrom incubés pendant 5-7 jours en AA, ANO et à 3% d'O ₂	173
Figure 55. Analyse des voies métaboliques utilisées par consommation de substrat spécifique dans des cultures de cellules hématopoïétiques CD34 ⁺ en condition d'ANO et à 3% d'O ₂	177
Figure 56. Analyse des voies métaboliques utilisées par consommation de substrat spécifique dans des cultures de cellules hématopoïétiques CD34 ⁺ en condition d'ANO et à 3% d'O ₂	178
Figure 57. Analyse des voies métaboliques utilisées par consommation de substrat spécifique dans des cultures de cellules hématopoïétiques CD34 ⁺ en condition d'ANO et à 3% d'O ₂	181
Figure 58. Analyse des voies métaboliques utilisées par consommation de substrat spécifique par des mitochondries isolées dans des cultures de cellules hématopoïétiques CD34 ⁺ en condition d'AA, d'ANO et à 3% d'O ₂	184
Figure 59. Analyse de l'implication du métabolisme du H ₂ S dans les cultures de cellules hématopoïétiques de CD34 ⁺ en AA, ANO et à 3% d'O ₂	186
Figure 60/Annexe 1. Tableau des résultats d'enrichissement pour le transcriptome des CStrom incubés en ANO et à 3% d'O ₂	205
Figure 61/Annexe 2. Tableau des résultats d'enrichissement pour le transcriptome des CStrom incubés en AA et à 3% d'O ₂	206
Figure 62/Annexe 3. Tableau des résultats d'enrichissement pour le transcriptome des CStrom incubés en AA et à ANO.....	207
Figure 63/Annexe 4. Tableau des résultats d'enrichissement pour le transcriptome des CStrom incubés en ANO et à 3% d'O ₂	208
Figure 64/Annexe 5. Tableau des résultats d'enrichissement pour le transcriptome des CStrom incubés en AA et à 3% d'O ₂	209
Figure 65/Annexe 6. Tableau des résultats d'enrichissement pour le transcriptome des CStrom incubés en AA et ANO.....	210
Figure 66/Annexe 7. Résultats de l'analyse du métabolome des CStrom incubés en AA, ANO et à 3% d'O ₂	212

TABLE DES ABREVIATIONS

Liste générale

α-KG : α -KétoGlutarate	1,3-BPG : 1,3-BisPhosphoGlycérate
2,3-BP : 2,3-bisphosphoglycérate	3-PG : 3-PhosphoGlycérate
AA : Anoxia/Aglycémie	AG : Acide Gras
Ala : Alanine	ALT : Alanine aminotransférase
AMP : Adénosine MonoPhosphate	Ang-1 : Angiopoïétine
Arn : Arginine	Asn : Asparagine
Asp : Aspartate	ADP : Adénosine DiPhosphate
ATP : Adénosine triphosphate	CoA : Coenzyme A
CI : Complexe I ou NADH-coenzyme Q oxydoréductase	CV : ATP synthase
CII : Complexe II ou succinate-coenzyme Q oxydoréductase	COX : Cytochrome c OXydase
CIII : Complexe III ou coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase	CS : Cellules Souches
CIV : Complexe IV ou Cytochrome c oxydase (COX)	CSC : Cellules Souches Cancéreuses
CoQ : Coenzyme Q ou ubiquinone	CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
CRM : Chaîne Respiratoire Mitochondriale	CStroM : Cellules stromales mésenchymateuses
CSA : Cellules Souches Adultes	Cyt-C : Cytochrome C
CSE : Cellules Souches Embryonnaires	FAD : Flavine adénine dinucléotide
CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses	F6P : Fructose 6-phosphate
Cys : Cystéine	G6P : Glucose-6-phosphate
DHAP : Dihydroxyacétone phosphate	Gln : Glutamine
F1,6BP : Fructose-1,6-biphosphate	His : Histidine
G3P : Glycérol 3-phosphate	HSC : Hematopoietic Stem Cell
Glc : Glutamate	Leu : Leucine
GLUD : Glutamate déshydrogénase	MCAM : Melanoma Cell Adhesion Molecule
HK : Hexokinase	MCT1 : Monocarboxylate 1
LDH : Lactate DésHydrogénase	MP : Membrane Plasmique
Lys : Lysine	MStroC : Mesenchymal Stromal Cell
Met : Methionine	NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
MO : Moelle Osseuse	PEP : phosphoénolpyruvate
MSC : Mesenchymal Stem Cell	Pi : Phosphate inorganique
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide	PP : Pentose phosphate
OxPhos : OXYdations PHOSphorylantes	SCF : Stem Cell Factor
PFK1 : Phospho-FructoKinase 1	SDF-1 : Stromal Cell-Derived Factor-1- α
PK : Pyruvate Kinase	Thr : Thréonine
Pro : Proline	TPP : Thiamine pyrophosphate
SC : Stem Cell	VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
Ser : Serine	
TPO : Thrombopoïétine	
Val : Valine	
VE : Vésicule extracellulaire	

Liste genes

ACYP1 : acylphosphatase 1	AKR1B10 : aldo-keto reductase family 1 member B10
AMDHD2 : amidohydrolase domain containing 2	ANGPTL4 : angiopoietin like 4
ANPEP : alanyl aminopeptidase, membrane	ASAH1 : N-acylsphingosine amidohydrolase 1
ASS1 : argininosuccinate synthase 1	B3GALT4 : beta-1,3-galactosyltransferase 4
CA9 : carbonic anhydrase 9	CERS6 : ceramide synthase 6
CYP27A1 : cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1 member 2	EIF4E2 : eukaryotic translation initiation factor 4E family
ENOSF1 : enolase superfamily member 1	ENO2 : enolase 2
GNPDA1 : glucosamine-6-phosphate deaminase 1	GSTO1/2 : glutathione S-transferase omega 1/2
HK2 : hexokinase 2	HEXB : hexosaminidase subunit beta
IGF1R : insulin like growth factor 1 receptor	IL4I1 : interleukin 4 induced 1
INSR : insulin receptor	KDSR : 3-ketodihydrospingosine reductas
LIPC : lipase C, hepatic type	LPIN3 : lipin 3
MAN1C1 : mannosidase alpha class 1C member 1	MT-ATP8 : mitochondrially encoded ATP synthase 8

NAMPT : nicotinamide phosphoribosyltransferase
NEU1 : neuraminidase 1
NQO1 : NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 like 2
PFKFB3 : 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
PRDX6 : peroxiredoxin 6 like 1
PSAT1 : phosphoserine aminotransferase 1
RRM2 : ribonucleotide reductase regulatory subunit M2
SRM : spermidine synthase sialyltransferase 5
SUCLG2 : succinate-CoA ligase GDP-forming subunit beta 1 like 1
VEGFA : vascular endothelial growth factor A

NANS : N-acetylneuraminate synthase
NPC1/2 : NPC intracellular cholesterol transporter 1/2
NDUFA4L2 : NDUFA4 mitochondrial complex associated
PFKP : phosphofructokinase, platelet
PRPS1L1 : phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1
PYCR1 : pyrroline-5-carboxylate reductase 1
SAT1/2 : spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1/2
ST3GAL5 : ST3 beta-galactoside alpha-2,3-
UAP1L1 : UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase

Liste proteins

ACADM : Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
AIMP1 : Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1
ALDH1A3 : Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3
ALDH18A1 : Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase ATP5PD
AP2A2 : AP-2 complex subunit alpha-2
ASNS : Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]

ATP6V1D : V-type proton ATPase subunit D
BIN1 : Myc box-dependent-interacting protein 1
CDK1 : Cyclin-dependent kinase 1
CLPX : ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like , mitochondrial
COL1A1 : Collagen alpha-1(I) chain
CPT2 : Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial
CRK : Adapter molecule crk
CTHRC1 : Collagen triple helix repeat-containing protein 1
CYB5R3 : NADH-cytochrome b5 reductase 3
DDRGK1 : DDRGK domain-containing protein 1
DERL2 : Derlin-2

DNAJA1 : DnaJ homolog subfamily A member 1
DNAJC3 : DnaJ homolog subfamily C member 3
EGFR : Epidermal growth factor receptor
EIF4A2 : Eukaryotic initiation factor 4A-II
EIF5B : Eukaryotic translation initiation factor 5B
ETFA : Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial
EZR : Ezrin
FAHD1 : Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial
FLOT1 : Flotillin-1

GCDH : Glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
GFPT1 : Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1
GLUD1 : Glutamate dehydrogenase 1

GNPAT : Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase
HK1 : Hexokinase-1
HSPA9 : Stress-70 protein, mitochondrial
IDH3A : Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha , mitochondrial
ITCH : E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog

ACAT1 : Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial
AK2/4 : Adenylate kinase 2/4, mitochondrial
ALDH2 : Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
ALDOA : Fructose-bisphosphate aldolase A
APPL2 : DCC-interacting protein 13-beta
ATP2B4 : Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4
BAG6 : Large proline-rich protein BAG6
CDC37 : Hsp90 co-chaperone Cdc37
CKB : Creatine kinase B-type
CNDP2 : Cytosolic non-specific dipeptidase

COX5A/B/2 : Cytochrome c oxidase subunit 5A/B/2
CRAT : Carnitine O-acetyltransferase
CS : Citrate synthase, mitochondrial
CTNNB1 : Catenin beta-1
DAB2 : Disabled homolog 2
DEC2 : Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase
DLST : Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial
DNAJB1 : DnaJ homolog subfamily B member 1
ECHS1 : Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial

EIF4G2 : Eukaryotic translation initiation factor 4γ2
ENO1/2 : α/γ-enolase
FAF2 : FAS-associated factor 2

GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/testis
GCLM : Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit
GLO1 : Lactoylglutathione lyase

GNAI3 : Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit α
GPI : Glucose-6-phosphate isomerase
HSD17B10 : 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2
IDH1 : Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic
IFI16 : γ-interferon-inducible protein 16

LAMTOR3 : Regulator complex protein LAMTOR3

LANCL1 : LanC-like protein 1
LDHA : L-lactate dehydrogenase A
LRPPRC : Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial
MAN1B1 : Endoplasmic reticulum mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase
MDH2 : Malate dehydrogenase, mitochondrial
MMUT : methylmalonyl-CoA mutase

MRPL39/49/45/13 : 39S ribosomal protein L13/49/45/13, mitochondrial
MTHFD1L : Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial
NDRG1 : Protein NDRG1

NDUFB3/4/9/10 : NADH dehydrogenase [ubiquinone] beta subcomplex subunit 3/4/9/10, mitochondrial
NDUFS2/3/4 : NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2/3/4, mitochondrial
NNT : NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial
NUP133/160 : Nuclear pore complex protein Nup133/Nup160
OGDH : 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial
OSBP : Oxysterol-binding protein 1
PCYOX1 : Prenylcysteine oxidase 1
PDHB : Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial
PKFP/L : ATP-dependent 6-phosphofructokinase
PHGDH : D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
PML : Protein PML

PPA2 : Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial

PRDX6 : Peroxiredoxin-6
PSMB4 : Proteasome subunit beta type-4
PSMD9 : 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9
PTCD3 : Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial
PTK7 : Inactive tyrosine-protein kinase 7

QKI : Protein quaking
RAB23 : Ras-related protein Rab-23
RAE1 : mRNA export factor
RCN3 : Reticulocalbin-3
SHMT2 : Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial
SLC2A1 : Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1
SPTLC2 : Serine palmitoyltransferase 2
SSBP1 : Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial
STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3
TBL2 : Transducin beta-like protein 2
TIMM50 : Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50
TPI1 : Triosephosphate isomerase
TST : Thiosulfate sulfurtransferase
UFL1 : E3 UFM1-protein ligase 1
UQCRC1/2 : Cytochrome b-c1 complex subunit 1/2, mitochondrial
VIM : Vimentin
WARS : Tryptophan-tRNA ligase, cytoplasmic

LARP1 : La-related protein 1
LONP1 : Lon protease homolog, mitochondrial
LTA4H : Leukotriene A-4 hydrolase
MAP1B : Microtubule-associated protein 1B

MIF : Macrophage migration inhibitory factor
MRPS34/35 : 28S ribosomal protein S34/35, mitochondrial
MTAP : S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase

MTOR : Serine/threonine-protein kinase

NDUFA5/9/10/13 : NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5/9/10/13, mitochondrial
NDUFS1 : NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa 1 subunit, mitochondrial
NDUFV1 : NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial
NUCB2 : Nucleobindin-2
OAT : Ornithine aminotransferase, mitochondrial
OPA1 : Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial
P4HB : Protein disulfide-isomerase
PDGFRB : Platelet-derived growth factor receptor beta
PDXK : Pyridoxal kinase

PGK1 : Phosphoglycerate kinase 1
PITRM1 : Presequence protease, mitochondrial
PNPT1 : Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial
PRDX3 : Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial
PSAT1 : Phosphoserine aminotransferase
PSMC2/5 : 26S proteasome regulatory subunit 7/8
PSME3 : Proteasome activator complex subunit 3
PTGIS : Prostacyclin synthase

PYCR1 : Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial
RAB5A : Ras-related protein Rab-5A
RAD23B : UV excision repair protein RAD23 homolog B
RARS2 : Probable arginine-tRNA ligase, mitochondrial
RPL23 : 60S ribosomal protein L23
SLC16A1 : Monocarboxylate transporter 1
SNX9 : Sorting nexin-9

SQOR : Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial
SSH1 : Protein phosphatase Slingshot homolog 1
STUB1 : E3 ubiquitin-protein ligase CHIP
THBS1 : Thrombospondin-1
TMED10 : Transmembrane emp24 domain-containing protein 10
TRMT10C : Mitochondrial ribonuclease P protein 1
UBQLN1 : Ubiquilin-1
UGP2 : UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
VCAN : Versican core protein
YTHDF1 : YTH domain-containing family protein 1

"Si vous n'aimez pas votre destin, ne l'acceptez pas. Au lieu de cela, ayez le courage de le changer comme vous le souhaitez."

Naruto Uzumaki

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LES CELLULES SOUCHES

Le corps humain est composé de plusieurs milliards de cellules diverses de par leur composition et leurs fonctions. Il existe ~200 types cellulaires différents. Ces cellules, regroupées en tissus tels que la peau, le sang, le foie et le système nerveux sont associés et forment des organes qui, eux-mêmes, font partie de systèmes organiques plus vastes, tels que le système digestif, contribuant ainsi à la constitution de l'organisme dans son ensemble. À l'âge adulte, les cellules matures (muscle, cœur, cerveau, etc...) n'ont plus la faculté de se diviser et de se reproduire. D'autres au contraire conservent ce potentiel.

1. ETABLISSEMENT DES CELLULES SOUCHES : DU MYTHE A L'ENTITE SPECIFIQUE

1.1. La quête de l'immortalité

L'histoire et la découverte du concept des cellules souches (CS) repose sur l'espoir de régénération et de rajeunissement menant à l'immortalité. Ces facultés extraordinaires ont toujours fasciné au point d'inspirer de nombreux mythes. Un exemple que l'on trouve dans la mythologie est l'histoire tragique de Prométhée qui a volé le feu sacré pour l'offrir aux hommes. Alors, Zeus le condamna à être attaché à un rocher sur le mont Caucase pendant que son foie serait dévoré par un aigle chaque jour. Chaque nuit le foie repousserait et serait dévoré par l'aigle chaque jour. Ici on voit déjà apparaître la notion de renouvellement des cellules, lorsque chaque nuit, le foie repousse.



Figure 1. Représentation de la régénération cellulaire dans l'histoire. A. Prométhée enchaîné, peinture de Pierre Paul Rubens, entre 1611 et 1618. Philadelphia Museum of Art. B. Céramique grecque représentant le combat d'Hercule contre l'Hydre de Lerne. C. Personnage de fiction inspiré des films de la franchise Marvel.

A défaut d'atteindre l'immortalité, le commun des mortels cherche à éviter le vieillissement et repousser la mort, autrement dit, le pouvoir de permettre aux cellules et tissus de se régénérer.

1.2. Origine et étude pionnière du concept des cellules souches

Le terme cellule souche apparaît dans la littérature scientifique dès 1868 dans les travaux du biologiste allemand Ernst Haeckel. Il a utilisé le terme allemand « Stammzelle » (Haeckel, 1872) pour décrire l'ancêtre unicellulaire présumé de tous les organismes multicellulaires évolués. Haeckel défendait depuis plusieurs années la théorie de Fritz Müller, autre biologiste allemand, ardent défenseur de la théorie de l'évolution darwinienne. Il émet l'idée que les phases successives du développement embryonnaire d'un organisme sont un rappel des états successifs atteints au cours de l'évolution par le groupe auquel appartient cet organisme (F. Müller, 1864). Cette idée sera généralisée par Valentin Häcker sous la forme d'une « loi biogénétique fondamentale » qui se révéla bien sûr erronée mais qui lui permit de faire l'analogie entre son concept de cellule souche pour l'évolution et le développement embryonnaire qui se déroule à partir d'une seule cellule. Il procéda donc à un rapprochement entre l'évolution (phylogénie) et l'embryologie (ontogénie), et proposa, en 1877, que l'œuf fertilisé soit aussi appelé cellule souche car il donne naissance à toutes les cellules de l'organisme (Haeckel, 1877).

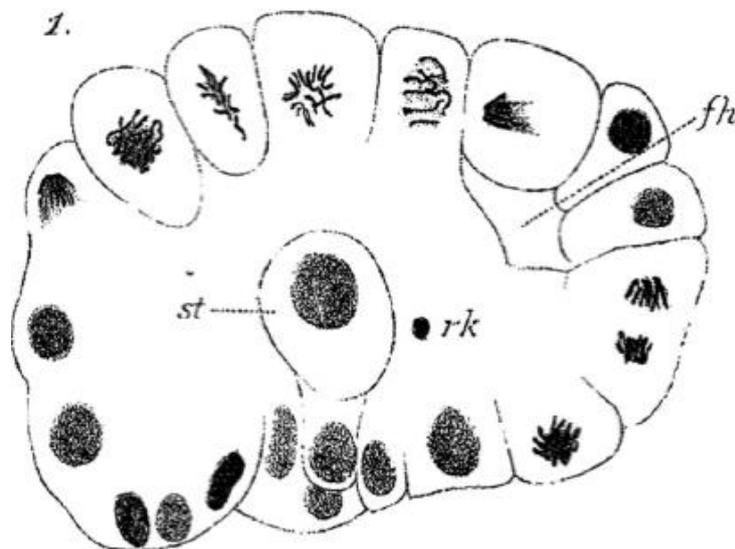


Figure 2. Diagramme de Valentin Häcker de 1892 de la cellule souche dans l'embryon de Cyclope. Selon Häcker, la CS vient de migrer vers l'intérieur de l'embryon et est sur le point de subir une division cellulaire asymétrique. Une cellule fille donnera naissance à la lignée germinale; l'autre donnera naissance à du tissu mésodermique.

A la suite de ces travaux le terme CS servait à définir une cellule distincte du cycle embryonnaire étant capable de donner naissance à plusieurs types de cellules spécialisées (Boveri, 1885).

Jusqu'au milieu du XXe siècle, les recherches sur les CS n'étaient pas approfondies. Seuls quelques chercheurs s'intéressent à l'étude des CS comme Alexandrowitsch Maximow, un médecin et biologiste qui a formulé la *théorie unitaire de l'hématopoïèse* (Maximow, 1924). Sa théorie repose sur le fait que toutes les cellules sanguines matures dérivent d'une population de CS situées dans la moelle osseuse (MO). Avec Otto Pappenheim, ils ont révolutionné notre compréhension de la formation et de la régénération des cellules sanguines et ont instauré les bases de la recherche en hématopoïèse moderne. Les travaux de A. Pappenheim (1870-1916) sur la formation du sang chez les amphibiens ont contribué à la découverte de l'hématopoïèse. Il est notamment le premier à avoir représenté l'ontogénèse de l'hématopoïèse sous la forme d'un « arbre » centré à la racine sur un « ancêtre commun » supposé de l'ensemble du système sanguin.

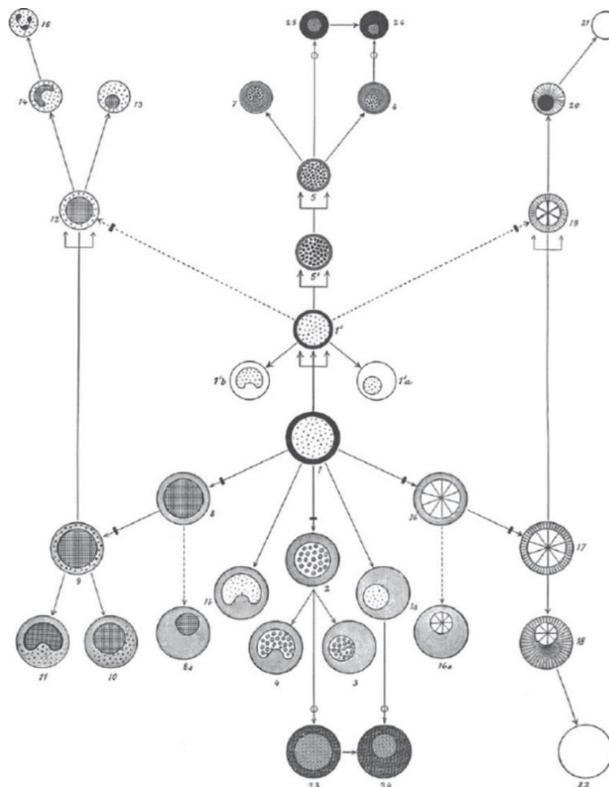


Figure 3. Schéma représentant le point de vue d'Artur Pappenheim sur l'hématopoïèse de 1905. La cellule au centre est l'ancêtre commun supposé de l'ensemble du système sanguin. Pappenheim a appelé cette cellule, entre autres termes, la cellule souche.

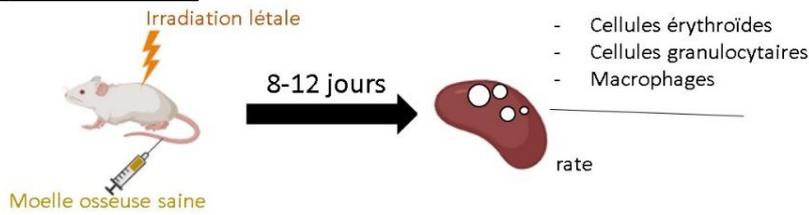
C'est alors qu'une catastrophe mondiale va précipiter les recherches sur les CS chez l'adulte (CSA). Les bombardements des villes d'Hiroshima et de Nagasaki, en août 1945, et leurs conséquences vont accélérer les recherches. Les victimes ayant survécu à la première vague ont peu à peu commencé à

mourir, non pas des blessures ou de brûlures causées par l'explosion, mais de symptômes mystérieux. Ces symptômes comprenaient principalement la perte de cheveux, un faible nombre de globules blancs, la destruction de l'estomac et de la muqueuse intestinale ainsi que des hémorragies internes (Double et al., 2011). En cherchant des explications, les scientifiques ont découvert que les radiations en étaient la cause. Le rayonnement attaque les cellules soit en provoquant directement la mort cellulaire, soit en perturbant la capacité que les cellules ont de se diviser pour créer de nouvelles cellules. Sans cellules capables de se diviser et de former de nouvelles cellules, les parties du corps telles que les cheveux et le sang ne peuvent se renouveler.

Dans les années qui suivirent, de nombreuses études vont porter sur l'exposition de souris aux rayons X afin de reproduire le même syndrome d'irradiation. Les animaux meurent dans les deux semaines suivant l'exposition. Les chercheurs s'orientent alors vers des protections en plomb permettant de stopper l'irradiation et découvrent rapidement que celles-ci permettent d'empêcher la détérioration des organes tels que la rate ou encore les os (Jacobson et al., 1949). En 1956, trois groupes de chercheurs montrent que l'injection directe de cellules de la MO dans des souris mortellement irradiées peut rétablir la production des cellules sanguines (Ford et al., 1956; Makinodan, 1956; Nowell et al., 1956). La conclusion de ces travaux est qu'il existe, dans l'organisme adulte, des cellules qui ont la capacité de se renouveler.

Ce sont les canadiens James Till et Ernest McCulloch qui ont apporté en 1961 la première preuve quantitative de l'existence de CS – sans les appeler ainsi – en travaillant sur les effets de la radiothérapie sur les tumeurs et les cellules sanguines (Till & McCulloch, 1961). En se basant sur les recherches menées après les bombardements nucléaires, ils ont injecté de la MO à des souris ayant préalablement été irradiées. Les souris transplantées présentaient des nodules à la surface de leur rate. La caractérisation fut difficile en raison de la grande rareté de ces cellules (1 cellule sur 10 000 dans la MO de souris) et de leur état de quiescence. Pour cela, ils ont mis au point une méthode permettant de quantifier les cellules progénitrices et de définir leur potentiel d'autorenouvellement, ainsi que leur capacité à se différencier en plusieurs types de cellules sanguines. Cette méthode représente l'une de leur plus importante contribution. C'est grâce à l'utilisation de marqueurs chromosomiques, que James Till et Ernest McCulloch ont pu établir la nature clonale des nodules spléniques observés chez leurs souris (Becker et al., 1963).

1) différenciation



2) Clonogénicité



3) Auto-renouveaulement (variable)

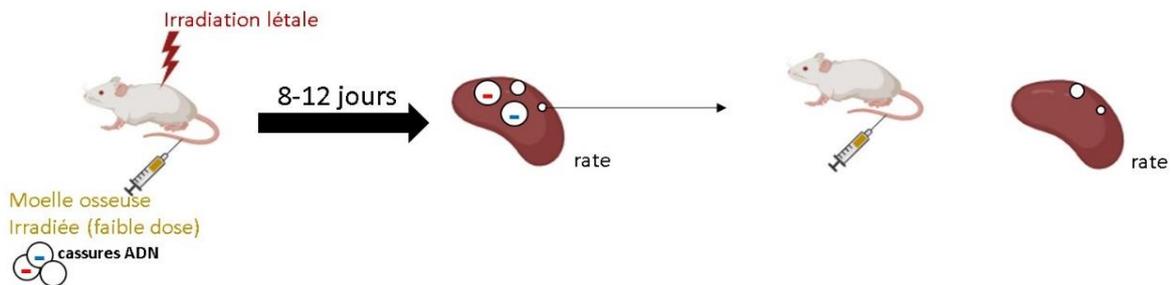


Figure 4. Représentation schématique des transplantations sériées de James Till et Ernest McCulloch. Ils ont permis la découverte des premières cellules multipotentes dont font partie les CS.

La relation linéaire directe entre le nombre de cellules de moelle transplantées et le nombre de nodules observés a permis aux chercheurs de conclure que chacun des nodules était issu d'une seule cellule, prouvant ainsi l'existence des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ils ont également démontré que les cellules des nodules spléniques pouvaient engendrer des colonies additionnelles lorsqu'elles étaient injectées à des souris réceptrices secondaires et que ces nodules différaient en terme de taille et de composition cellulaire, indiquant une capacité d'autorenouvellement variable. Ce type d'expérience, appelée transplantation sériée, est devenu un test classique qui permet de déterminer le potentiel d'autorenouvellement d'une population cellulaire.

Dans le même temps, Alexander Friedenstein découvre un autre type de CS. Ces cellules sont capables de former des colonies de cellules fibroblastiques et de se différencier en plusieurs types cellulaires (Friedenstein et al., 1970; Prockop, 1997). Dans les années 1960, il a isolé, à partir de la MO, des cellules adhérentes de type fibroblastique, capables de se développer rapidement *in vitro* sous la forme de colonies (colony-forming unit-fibroblast; CFU-F). Il décrit des cellules immatures de la MO de souris capables de développer, après implantation sous la capsule rénale, du tissu fibreux, de l'os, et un mélange de MO et d'os. Chaque colonieensemencée sous la capsule rénale a donné naissance, quelques semaines suivant la transplantation, à des cellules de la MO ainsi qu'à du tissu osseux. Les différentes expériences et l'utilisation de souris chimériques lui ont permis de démontrer que les

cellules du tissu fibreux et de l'os provenaient du donneur, tandis que les cellules hématopoïétiques de la MO provenaient du receveur, indiquant ainsi que certains des précurseurs mésenchymateux avaient une fonction stromale de soutien de l'hématopoïèse. Le terme mésenchymateux fait référence à l'origine embryonnaire des cellules, en particulier des cellules issues de la couche germinale du mésoderme. La couche germinale du mésoderme est l'une des trois couches germinales primaires qui se forment au cours des premiers stades du développement embryonnaire. Le mésoderme donne naissance à divers types de tissus conjonctifs, tels que les muscles, les os, le cartilage et la graisse, ainsi qu'aux cellules qui forment les vaisseaux sanguins, les cellules sanguines et le système urogénital. En raison de la capacité de ces cellules à se différencier en ostéoblastes, Alexander Friedenstein leur a donné le nom de cellules souches ostéogéniques (Friedenstein et al., 1968). Par la suite, il a remarqué que ces cellules issues de colonies CFU-F se caractérisaient par leur capacité à se différencier *in vitro* non seulement en ostéocytes, mais aussi en chondrocytes et adipocytes (Friedenstein et al., 1974).

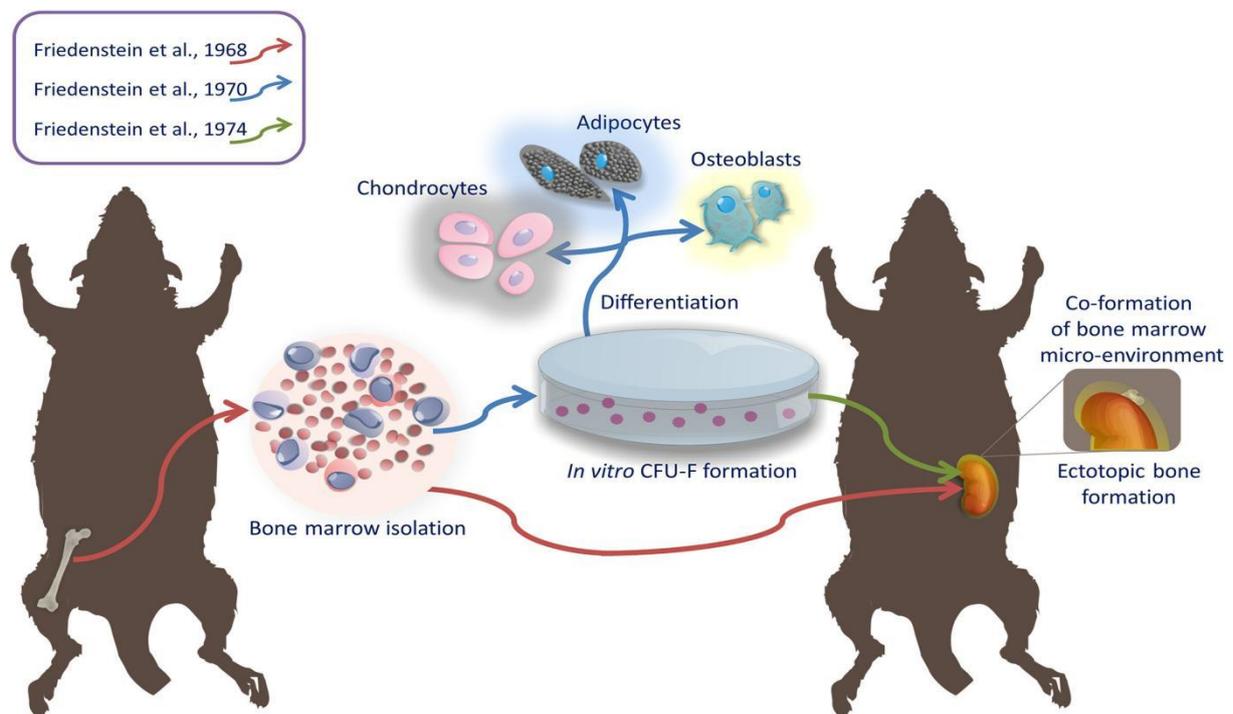


Figure 5. Schéma représentant la recherche expérimentale sur les CS du tissu conjonctif dérivées de la MO, qui ont ensuite été appelées « cellules souches mésochondrocytaires ». Ce schéma est tiré de STEM CELLS, Volume: 37, Issue: 7, Pages: 855-864, 2019 (Andrzejewska et al., 2019).

Toutes les études d'Alexander Friedenstein ont permis la découverte des CSM. Il a démontré que la MO contenait une population cellulaire, distincte des CSH, qui est clonogénique, capable d'un auto-renouvellement prolongé et d'une différenciation en plusieurs lignées de cellules d'origine

mésodermique. Ces cellules remplissent donc les critères d'auto-renouveaulement et de multipotence des CS, élaborés par James Till et Ernest McCulloch.

De leurs travaux s'ensuit une longue liste de découvertes et d'avancées sur la compréhension des CS. En 1992, les travaux de Brent Reynolds et Samuel Weiss prouvent l'existence de la neurogenèse chez l'adulte et donc de la présence de cellules souches neuronales (Reynolds & Weiss, 1992). En 1993, le Dr Rossant et son collègue le Dr Andras Nagy ont démontré que les cellules souches embryonnaires (CSE) sont entièrement pluripotentes - ce qui signifie qu'elles ont la capacité de se transformer en n'importe quelle cellule du corps - en générant des souris dérivées de CSE (Rossant et al., 1993).

Avec l'émergence de nouvelles techniques d'identification et de caractérisation des CS, leur classification a pu être définie. L'utilisation de souris dans des transplantations sériées, ou de milieu spécifique pour la caractérisation *ex vivo* (methylcellulose, milieu de différenciation) a permis de définir les CS. De plus, leur origine variée et leur capacité de différenciation multiple a permis d'établir des classifications spécifiques aux différentes population de CS.

2. L'ENTITÉ CELLULES SOUCHES

2.1. Définition des cellules souches

Les CS sont des cellules indifférenciées, morphologiquement indiscernables et qui sont capables de se diviser pour générer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire. Elles sont également capables de se maintenir dans l'organisme par division symétrique ou division asymétrique (figure 6). Elles sont caractérisées par deux capacités essentielles : celle de se différencier en cellules spécialisées matures (multipotence) et donc de contribuer à renouveler un tissu, et celle d'autorenouveaulement qui permet à la cellule de se diviser et donc de garder son pool de cellules pendant de longues périodes.

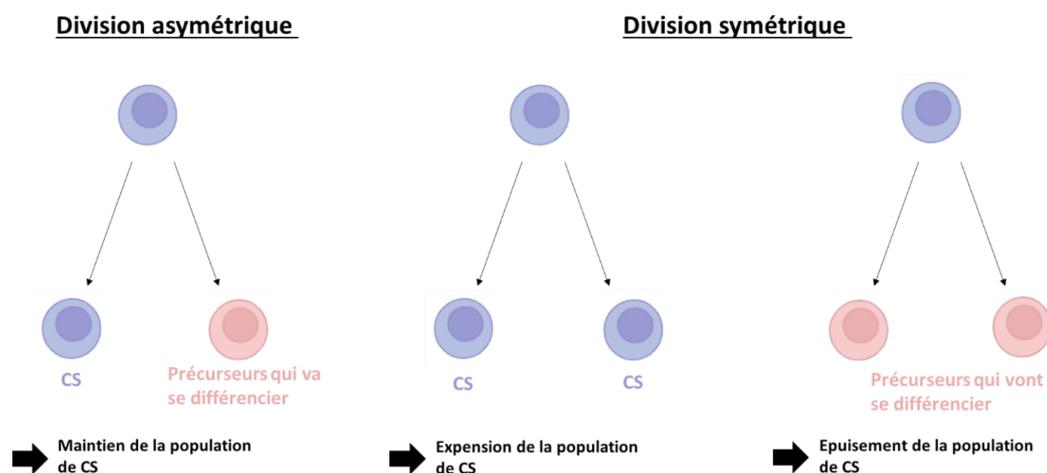


Figure 6.Représentation schématique des différents modes de divisions des CS

2.2. Classification des cellules souches

Il existe plusieurs types de cellules souches, chacune ayant des caractéristiques et des capacités de différenciations spécifiques.

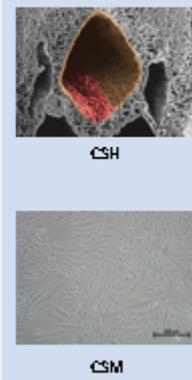
Cellules souches			
Origine	Totipotentes	Pluripotentes	Multipotentes
	Individu complet	Organismes sans annexes embryonnaires	Lignées cellulaires
Exemple	 <p>Zygote</p> <p>Morula Stade 8 cellules</p>	 <p>Blastocyste</p>	 <p>CSH</p> <p>CSM</p>

Tableau 1. Récapitulatif des différents types de cellules souches

2.2.1 Les cellules souches totipotentes

Les cellules souches totipotentes peuvent se différencier en tous les types cellulaires, embryonnaires et extra-embryonnaires et peuvent donner à elles seules un organisme vivant entier lorsqu'elles sont réimplantées chez une mère porteuse. Les seules vraies cellules totipotentes sont l'embryon au stade zygote et les cellules filles jusqu'au stade 8 cellules.

2.2.2. Les cellules souches pluripotentes

Les cellules pluripotentes sont les cellules filles issues des cellules totipotentes. Elles dérivent de la masse interne du blastocyste. Elles ont déjà subi une première étape de différenciation, puisque les cellules de la masse interne se sont différenciées en cellules du trophoctoderme et peuvent générer les cellules des trois lignées germinales, endodermique, mésodermique, et ectodermique. Elles ont donc la capacité de donner un organisme en entier mais ne peuvent fournir l'environnement propice

à son développement : les annexes tel que le placenta. C'est le cas des CSE. Les CSE sont largement utilisées en recherche biomédicale pour étudier le développement embryonnaire, la régénération tissulaire, les mécanismes de maladies, la toxicologie et le criblage de médicaments. De par leur capacité à donner tous les tissus d'un organisme les CSE ont un immense potentiel en médecine régénérative. On envisage de les utiliser pour traiter des maladies et des blessures en remplaçant les tissus endommagés ou dégénérés par des cellules saines dérivées de CSE.

Cependant, la recherche et l'utilisation des CSE ont suscité des controverses en raison du fait qu'elles sont obtenues à partir d'embryons humains. Elles soulèvent donc des questions éthiques sur la vie embryonnaire. Ces questionnements ont conduit à des débats et des réglementations sur l'utilisation des CSE. Selon l'article L2151-2-3-4 du décret du 6 août 2013 : « La conception *in vitro* d'embryons ou la constitution par clonage d'embryon humain à des fins de recherche est interdite » ; « La création d'embryons transgéniques ou chimériques est interdite » ; « Un embryon humain ne peut être ni conçu, ni constitué par clonage, ni utilisé à des fins commerciales ou industrielles » ; « Est également interdite toute constitution par clonage d'un embryon humain à des fins thérapeutiques ». Cependant, ces règles s'appliquent moins aux autres animaux. Par exemple, les CSE de souris sont très utilisées.

2.2.3. Les cellules souches multipotentes

Les cellules souches multipotentes sont des cellules qui peuvent donner différents types de cellules, mais uniquement celles issues de leur origine embryonnaire, ectoderme, mésoderme, ou endoderme. Elles sont dites déterminées. Elles sont présentes chez l'embryon et chez l'adulte. Les cellules souches unipotentes peuvent se différencier en un seul type cellulaire mais peuvent s'auto-renouveler comme les cellules souches. Il convient de noter que ces définitions ont un aspect très théorique. Pour certains experts, il n'existe pas de cellules unipotentes qui correspondent à des cellules dites progénitrices à capacité de division limitée (Petrik et al., 2022). Les CS adultes (CSA) sont capables de se diviser pour générer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire et de se maintenir dans l'organisme par division symétrique ou asymétrique (voir figure 6). Elles sont donc caractérisées par deux capacités essentielles : La capacité de différenciation qui permet de se différencier en cellule spécialisée mature et donc de renouveler un tissu ainsi que la capacité d'auto-renouvellement, qui permet le maintien du pool de cellules pendant de longues périodes.

Les cellules souches adultes, ont été identifiées dans un large éventail de tissus, à savoir, la peau, le cœur, le cerveau, le foie et la moelle osseuse. Ces exemples de cellules souches somatiques adultes illustrent la diversité des cellules souches présentes dans le corps humain et leurs rôles dans la

régénération, la réparation tissulaire et le maintien de la fonction des tissus et des organes, comme par exemple la croissance d'une nouvelle peau chaque jour chez l'homme (longévité). Les recherches sur les cellules souches adultes sont toujours actives afin de développer des thérapies régénératives et de nouvelles approches pour traiter diverses maladies et lésions.

2.2.4. Les cellules souches pluripotentes induites (iPS)

Jusqu'à dans les années 2000, les CS pluripotentes utilisées étaient issues d'embryons et posaient donc, comme mentionné au-dessus, un problème d'éthique. De plus, leur utilisation en thérapie cellulaire et/ou génique soulève un problème d'incompatibilité immunologique entre le donneur et le patient receveur (Auchincloss & Bonventre, 2002).

Cependant une avancée majeure en 2006 des professeurs Kazutoshi Takahashi et Shinya Yamanaka, a permis l'obtention d'iPS (K. Takahashi & Yamanaka, 2006). Il montre que ces cellules sont induites par l'introduction de quatre gènes clés (Oct4, Sox2, c-Myc et klf4) chez la souris. Shinya Yamanaka et son équipe ont démontré qu'il était possible d'obtenir ces cellules à partir de fibroblastes humains (K. Takahashi et al., 2007). Cette découverte lui a valu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 2012. Il a reprogrammé des cellules différenciées en cellules pluripotentes qui ont le potentiel de se différencier en n'importe quel type de cellule du corps, tout comme les CSE.

2.2.5. Les cellules souches cancéreuses (CSC)

Les CSC, également connues sous le nom de CS tumorales ou CS du cancer, sont un sous-ensemble de cellules présentes dans les tumeurs cancéreuses. Le concept de CSC a été proposé en 1994 dans un article de Nature (Lapidot et al., 1994) qui décrit la croissance lente des CSC dans des leucémies. Les traitements sont actifs sur les cellules à croissance rapide mais sont inefficaces sur les CS tumorales à croissance lente. Ces cellules partagent certaines caractéristiques des CS normales, telles que l'auto-renouvellement et la capacité de se différencier en divers types cellulaires présents dans la tumeur (Rosen & Jordan, 2009), et présentent aussi des similitudes sur le plan métabolique (Vlaski-Lafarge et al., 2020). Ces caractéristiques participent notamment à la résistance au traitement, la récurrence, la progression tumorale et la diversité cellulaire au sein de la tumeur.

Dans la suite de cette thèse nous allons nous focaliser sur deux types de CSA, les CSM et les CSH.

3. LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES ET LES CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES

3.1. Les cellules souches mésenchymateuses

3.1.1. Classification des cellules stromales mésenchymateuses et des cellules souches mésenchymateuses

Des expériences de Alexander Friedenstein découlent d'autres travaux ayant mis en évidence les caractéristiques de ces populations de cellules de MO. Des études ultérieures ont montré que la population cellules souches mésenchymateuses (CSM) était clairement distincte d'autres populations cellulaires présentes dans la MO (cellules endothéliales ou hématopoïétiques) (Delorme et al., 2008). Le terme CSM est apparu dans les années 1990, en raison de leur capacité à se différencier en plus d'un type de cellules qui forment du tissu conjonctif, le mésenchyme (Caplan, 1991). C'est un tissu embryonnaire dérivé du mésoderme, qui se différencie en tissu hématopoïétique et conjonctif. Les cellules stromales sont aussi des cellules du tissu conjonctif, qui forment la structure de soutien dans laquelle résident les cellules. Ce nom est devenu très populaire et est actuellement le plus utilisé, même s'il a soulevé des doutes sur le degré souche des cellules. Aujourd'hui, il existe de nombreux substituts dans la littérature pour l'abréviation des CSM tel que cellules stromales multipotentes, cellules stromales de la MO, CS mésodermiques, et bien d'autres encore. Arnold Caplan, dans son dernier ouvrage recommande de renommer ces cellules en « Cellules de signalisation médicales » notamment en raison des effets thérapeutiques induits après transplantation, à savoir la sécrétion de facteurs facilitant les processus régénératifs (Caplan, 2017).

La Société internationale de thérapie cellulaire (ISCT) a publié en 2006 les critères définissant la population des CSM (Dominici et al., 2006), qui ont été acceptés par la communauté scientifique mondiale. Ces lignes directrices recommandent l'utilisation du nom de cellules stromales mésenchymateuses multipotentes ; cependant, le nom de « cellules souches mésenchymateuses » reste le plus utilisé.

Les cellules mésenchymateuses que nous utilisons dans les laboratoires sont une population de cellules hétérogènes composée d'une majorité de progéniteurs et de rares cellules souches. Cette rare proportion de cellules rend leur étude et leur utilisation difficiles. Selon leur origine, les CSM présentent des différences en fonction de leur potentiel de différenciation (Meirelles et al., 2006) et de leur profil d'expression génique (Covas et al., 2008). Il est très difficile de différencier les progéniteurs des cellules souches du fait de leur similitude morphologique et phénotypique. Cette ressemblance interroge sur la vraie nature des CSM (Ivanovic, 2023).

Nous allons utiliser le terme cellules stromales mésenchymateuses (CStroM) regroupant les cellules donnant les cellules fibroblastiques totales (Stromales car elles sont isolées de tissus conjonctif (stroma) de MO) et CSM pour les cellules souches qui ont les caractéristiques associées aux cellules souches capables d'autorenouvellement et de multipotence.

3.1.2. Critères d'identification des cellules stromales mésenchymateuses

Les conditions d'identification des CStroM sont :

- la croissance de cellules *in vitro* en tant que population adhérentes au plastique ;
- un phénotype caractérisé par la présence de cluster de différenciation CD73, CD90, antigènes de surface CD105 et le manque d'expression de protéines telles que CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, ou CD19, ou antigènes du complexe d'histocompatibilité de classe II (humain antigènes leucocytaires de classe II) ;
- La capacité de différenciation *in vitro* vers les voies ostéogénique, chondrogénique et adipocytaire.

L'expression de l'ALDH est considérée comme un marqueur universel, pour l'identification de CS normales et malignes provenant de sources multiples (Ahmed Laskar & Younus, 2019). L'ALDH est donc reconnue comme importante pour de multiples activités biologiques, notamment la résistance aux médicaments, la différenciation cellulaire et la réponse au stress oxydatif (Douville et al., 2009). Il est également considéré comme un marqueur de cellules souches de la population MStroC issue de pratiquement toutes les sources : moelle osseuse (Moreb, 2008; Najar, Dollé, et al., 2018; Nishimoto et al., 2007), tissu adipeux (Najar, Dollé, et al., 2018) , gelée de Wharton (Najar et al., 2019), prépuce (Najar, Crompot, et al., 2018), etc. La population de MStroC peut donc être séparée en deux sous-populations en ce qui concerne l'expression de l'ALDH : ALDH⁻ et ALDH⁺. Chacune de ces deux populations de MStroC présente un modèle distinct d'expression génique lié à certaines propriétés souches (prolifération, réponse à l'hypoxie, phénotype, potentiel multilignée, etc.) (Nishimoto et al., 2007).

Ces critères et marqueurs d'identification ne sont pas spécifiques aux CSM. En effet les progéniteurs engagés qui ne sont pas a propement parlé des CS expriment certains de ces marqueurs et sont des populations de cellules adhérentes. En attendant, un complément est apporté par des études fonctionnelles, en plus de la caractérisation phénotypique, afin d'homogénéiser les protocoles de préparation des CStroM pour une application donnée. Le test, qui nous permet de déterminer les populations de CSM « réelles » est le test « single-cell » (Figure 8). Ce test permet de montrer

fonctionnellement la capacité d'une cellule à former des colonies dans des cultures primaires et secondaires et à se différencier dans les trois types de cellules spécialisées (Loncaric et al., 2019).

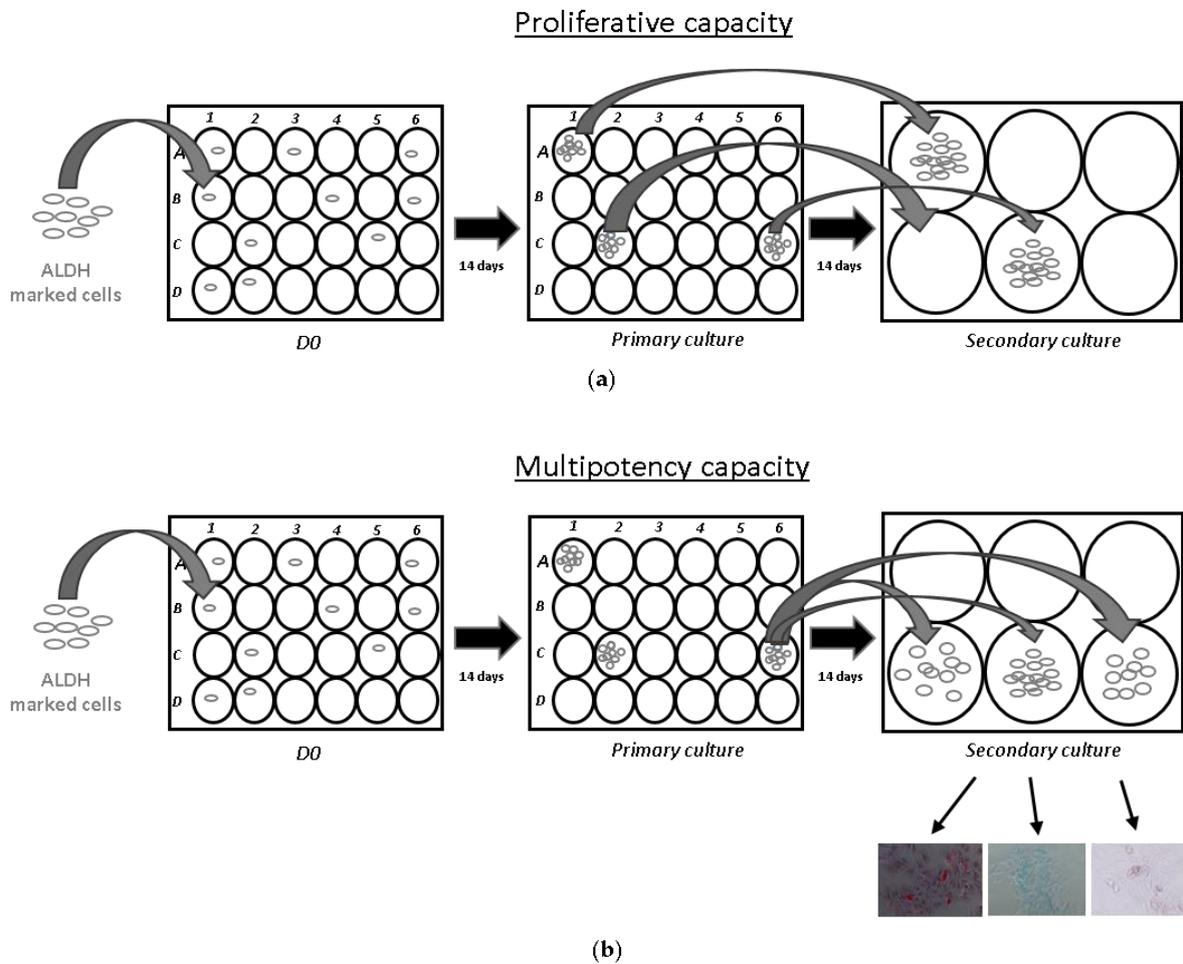


Figure 7. Approche d'évaluation de la capacité de prolifération et de différenciation unicellulaire de la population de CStrom totale. (a) Capacité de prolifération par approche de cultures primaires et secondaires unicellulaires : les cellules stromales mésenchymateuses ont été marquées pour l'ALDH et triées par cytométrie en flux sur la base de l'expression de l'ALDH après 4 jours de culture exposées à un faible (0,1 % d'O₂) ou concentration élevée en oxygène (20 % O₂). Après tri, les cellules (une cellule par puits) ont été étalées dans des cultures primaires. Après 14 jours, le contenu cellulaire total d'une colonie a été transféré dans une culture secondaire et analysé après 14 jours. (b) Potentiel de différenciation évalué par l'approche de cultures de différenciation unicellulaire : les MStroC ont été étiquetées, triées et étalées comme décrit sur la figure 1a. Après 14 jours, le contenu cellulaire de chaque puit donnant une colonie a été divisé en trois puits distincts. Chaque contenu cellulaire des trois puits a ensuite été soumis à une voie de différenciation grâce à l'ajout d'un milieu de différenciation pour la différenciation adipo-chondro- et ostéogénique.

Ces cellules sont d'une importance majeure dans les thérapies cellulaires et notamment pour leur forte capacité proliférative (100 à 500 cellules pouvant donner plus d'un demi-milliard de cellules filles (Haynesworth et al., 1992). En culture *in vitro* avec la présence de facteur de croissance (IL-6, IL-8, VEGF, Jenhani et al., 2011) et bFGF (Tasso et al., 2012), les CSM peuvent se différencier en cellules des trois feuilletts embryonnaires. Les CSM ont été décrites comme étant périvasculaires et, par conséquent, présentes dans de nombreux tissus de l'organisme (Crisan et al., 2008) (Muscle, pulpe

dentaire, tissu osseux, cartilage, vaisseaux sanguins, moelle osseuse, gelée de Wharton, tissu adipeux, sang ombilical).

L'importance de ces cellules vient de leur multiples rôles qui ne s'arrête pas à la seule capacité souche.

3.1.3. Rôle physiologique des cellules stromales mésenchymateuses

a. Rôle de maintien des tissus

Ces cellules sont un enjeu majeur en thérapie régénérative du fait de leur propriété souche et de leur capacité de différenciation qui les rendent particulièrement précieuses pour la régénération et la réparation des tissus endommagés ou vieillissants (renouvellement normal des cellules). Les CStroM sont des CS tissulaires multipotentielles donnant naissance aux tissus conjonctifs du squelette : os, cartilage, stroma médullaire et aux adipocytes. De façon plus contestée, elles seraient à l'origine des cellules musculaires sarcomériques (squelettiques et cardiaques) et des cellules endothéliales, voire à des cellules d'origine non mésodermique, tels les hépatocytes ou les cellules neurales (Sensebé & Bourin, 2009).

b. Rôle de soutien des cellules souches hématopoïétiques

Les CStroM jouent un rôle important dans le soutien à la fonction des CSH dans la MO. Les CStroM contribuent, dans la moelle osseuse, un microenvironnement stromal qui fournit au CSH un support physique et structural (Méndez-Ferrer et al., 2010). Ces interactions régulent le devenir des CSH en jouant sur l'auto-renouvellement, la survie, la prolifération, la différenciation et la migration. Dans une étude menée par le laboratoire, la co-culture de CStroM et CSH à basse concentration en O₂ a permis la préservation de la capacité souche des CSH cultivées dans ces conditions. L'analyse des cellules de la MO de souris après l'injection des cellules en co-culture a montré une augmentation du caractère souche des CSH (Hammoud et al., 2012). Le fait de reproduire les conditions présentes dans la niche durant les cultures *in vitro* est un paramètre essentiel et démontre l'importance du lien entre les CSM et les CSH dans cette niche hypoxique. Une expérience de co-culture a montré que les CStroM protégeaient les CSH de l'apoptose induite par les radiations et maintenaient la reconstitution hématopoïétique après une co-greffe chez des babouins mortellement irradiés (Drouet et al., 2005).

Ce rôle de soutien se fait par des interactions directes et indirectes entre les cellules. L'adhésion cellulaire direct entre CSH et CSM se fait par des molécules d'adhésions comme le « Vascular Cell Adhesion Molecul-1 » (VCAM-1/CD106) et le « Melanoma Cell Adhesion Molecule » (MCAM/CD146),

(Konopleva et al., 2009). Les CSH les plus primitives expriment davantage de récepteurs au CSM et, l'adhésion *in vitro* de progéniteurs hématopoïétiques aux CSM leur permet de maintenir leur fonction de reconstitution à long terme (Wagner et al., 2007). Les CStrom libèrent des molécules telles que des chimiokines ou des cytokines. Ces facteurs-clés sont par exemple le « Stem Cell Factor » (SCF), le « Stromal Cell-Derived Factor-1- α » (SDF-1/CXCL12), la Thrombopoïétine (TPO) ou l'Angiopoïétine (Ang-1).

Les CStrom possèdent un rôle paracrine qui leur permet aussi de réguler l'autorenouveaulement, la quiescence et la survie des CSH mais aussi d'avoir une action thérapeutique.

c. Rôle paracrine

Il aura fallu quelques années et notamment le travail de l'équipe de Massimiliano Gnecci pour envisager de mimer l'action thérapeutique des CStrom par leurs produits de sécrétion (Gnecci et al., 2005).

Le "sécrétome" fait référence à l'ensemble des protéines, facteurs de croissance, cytokines et autres substances sécrétées par les cellules. Le sécrétome des CStrom est particulièrement intéressant car il joue un rôle crucial dans leur capacité à influencer leur environnement.

Les CStrom agissent sur la quiescence des CSH en bloquant le cycle cellulaire par la sécrétion de forte quantité de la chimiokine SDF-1 (Sugiyama et al., 2006). La sécrétion de cytokines Ang-1 permet de garder les CSH en dormance grâce à l'activation de voie de signalisation PI3K/AKT via la liaison au récepteur Tie-2 qu'elles expriment (Wilson & Trumpp, 2006), et de protéger leur capacité de repopulation à long terme en inhibant l'apoptose chimio-induite (Arai et al., 2005).

Parmi les facteurs sécrétés par les CStrom, certains sont libres, solubles, alors que d'autres sont associés à des vésicules membranaires. Les vésicules extracellulaires (VE) sont des structures sub-cellulaires contenant du cytosol des cellules sécrétantes, enfermées dans une bicouche lipidique. En 2009, Bruno et ses collègues ont montré que les CStrom sécrètent des petites structures vésiculaires ayant un effet protecteur contre les lésions tubulaires aiguës rénales (Bruno et al., 2009). Les VE sécrétés par les CStrom sont en fait une classe spécifique appelée exosomes, qui a une origine endosomale et exprime des marqueurs spécifiques tels que Alix, TSG101 et Tetraspanins (Lai et al., 2010). De nos jours, les CStrom sont connues comme sécrétant plusieurs classes de VE dénommées microvésicules, microparticules et exosomes. Cependant ces VE n'ont pas de critères physiques et biochimiques bien définis, permettant de les catégoriser. Mais il a été démontré que les CStrom peuvent produire une plus grande quantité d'exosomes que d'autres cellules, telles que les

myoblastes, ou la lignée des cellules rénales embryonnaires humaines (HEK), (Yeo et al., 2013). Les exosomes des CStroM sont étudiés pour leur potentiel en tant que thérapie régénérative autonome. Ils peuvent être isolés, produits à large échelle et administrés directement pour traiter diverses affections. Des études *in vivo* ont déjà montré que les VE dérivées des CStroM ont des effets thérapeutiques encourageants dans divers modèles d'animaux et diverses maladies telles que des lésions tissulaires en réduisant la fibrose (Gatti et al., 2011), des maladies inflammatoires en inhibant l'inflammation artérielle dans les poumons (C. Lee et al., 2012; Y. Zhu et al., 2014) et des maladies cardiovasculaires. Par exemple, la présence de VE a permis l'augmentation de l'angiogenèse dans un modèle de maladie cardiovasculaire (Lai et al., 2010; Sluijter et al., 2014). Ces nanoparticules peuvent être caractérisées de plus en plus finement concernant leurs marqueurs phénotypiques, leurs contenus en protéines (facteurs de croissance, de différenciation, de transcription), en acides nucléiques (ADN, ARN régulateurs...), en lipides, et leurs fonctionnalités biologiques. Elles présentent peu, voire pas d'immunogénicité, une biodistribution large et durable, et peuvent donc être administrées de manière répétée par voie systémique (Mokarizadeh et al., 2012).

L'angiogenèse, le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, est une fonction importante associée à ce sécrétome. Les CStroM sécrètent des VE enrichies en plusieurs facteurs pro-angiogéniques, tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), le facteur de croissance des fibroblastes de base (bFGF), le facteur de croissance plaquettaire (PDGF) et d'autres. Ces facteurs stimulent la migration, la prolifération et la formation de tubes par les cellules endothéliales, qui forment la paroi des vaisseaux sanguins. Le sécrétome des CStroM contient des facteurs de survie cellulaire, tels que l'IL-6 et l'IL-8, qui favorisent la survie des cellules endothéliales nouvellement formées. Cela contribue à la maturation des nouveaux vaisseaux sanguins. Les CStroM peuvent influencer le recrutement de cellules souches endothéliales, qui sont impliquées dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Les facteurs de croissance sécrétés par les CStroM peuvent attirer ces cellules vers les sites où l'angiogenèse est nécessaire.

L'ensemble des modulations dont nous avons déjà évoqué l'existence permet aux CStroM de soutenir la formation de ces nouveaux vaisseaux sanguins.

d. Rôle immunomodulateur

Les CStroM peuvent influencer l'activation et la différenciation des lymphocytes T, ce qui est crucial pour la réponse immunitaire adaptative. Au début des années 2000, des scientifiques ont montré que les CStroM ont des capacités immuno-modulatrices *in vitro* dans des réactions lymphocytaires mixtes (A. Bartholomew et al., 2002).

En 2005, Sarah Glennie, a montré que des CStroM murines pourraient inhiber la prolifération de lymphocyte B *in vitro* (Glennie et al., 2005). Plus tôt, il a été démontré que les CStroM interfèrent avec la différenciation, la maturation et les fonctions des cellules dendritiques (W. Zhang et al., 2004). Une régulation adéquate des cellules dendritiques est donc essentielle pour éviter des réponses immunitaires excessives.

Plus tard, Grazia Maria Spaggiari a montré que les CStroM inhibent l'activation et la prolifération des cellules NK (Nature killer), (Spaggiari et al., 2006). Cette inhibition peut être bénéfique dans des situations où une réponse immunitaire excessive pourrait endommager les tissus sains.

Les effets immuno-modulateurs des CStroM sur différentes cellules immunitaires sont exécutés conjointement par des contacts cellulaires et des facteurs sécrétés. En utilisant un système de chambre avec une membrane semi-perméable laissant passer les facteurs solubles mais séparant physiquement les CStroM des autres types cellulaires, une autre équipe a montré que la faculté immunosuppressive des CStroM était due à des facteurs solubles (Di Nicola et al., 2002). Les CStroM produisent des facteurs anti-inflammatoires, tels que l'interleukine-10 (IL-10) et le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β), qui ont la capacité d'inhiber l'activation des cellules immunitaires pro-inflammatoires, comme les lymphocytes T et les macrophages.

Cette capacité peut être exploitée dans le traitement de maladies auto-immunes, de réactions inflammatoires excessives et dans d'autres domaines de la médecine régénérative et de l'immunothérapie.

e. Domiciliation « homing »

La domiciliation (en anglais "homing") fait référence à la capacité de ces cellules à migrer et à se diriger vers des sites spécifiques de l'organisme. Le processus de domiciliation est essentiel pour que les CStroM puissent exercer leur potentiel thérapeutique dans la régénération tissulaire et dans d'autres applications médicales. Ce processus est principalement composé d'étapes d'activation, d'adhésion et de migration transendothéliale. En réponse à une blessure, à des signaux immunitaires ou à une

hypoxie, les récepteurs et les chimiokines stimulées et libérées, activent les CStrom. Indépendamment de l'interaction spécifique récepteur-ligand, le rôle de l'étape d'activation est d'augmenter l'affinité des intégrines permettant l'immobilisation cellulaire en induisant des changements conformationnels dans leurs domaines extracellulaires (Constantin et al., 2000; C.-S. Lin et al., 2013). Les CStrom activées sont mobilisées à la périphérie de la circulation sanguine. L'étape d'adhésion est principalement réalisée par l'interaction spécifique entre de nombreuses chimiokines tels que SDF1 et les récepteurs de homing tel que CXCR4. La fixation initiale est facilitée par des sélectines exprimées par les cellules endothéliales. Les CStrom expriment le CD44, qui se lie aux sélectines et fait rouler la cellule le long de la paroi vasculaire (Sackstein et al., 2008). La deuxième étape, l'activation, est facilitée par les récepteurs de chimiokines couplés aux protéines G, généralement en réponse aux signaux inflammatoires. En effet, les souris soumises à une irradiation corporelle totale ou locale ont des niveaux plus élevés de CStrom en raison de la réponse inflammatoire qui en résulte (François et al., 2006). L'expression du SDF-1 sur les cellules endothéliales est considérée comme critique pour cette seconde étape (Lau & Wang, 2011). Il serait le ligand du récepteur de chimiokine CXCR4, exprimé par les CStrom (Gao et al., 2009; Honczarenko et al., 2006; Wynn et al., 2004).

La troisième étape, l'arrêt, est facilitée par les intégrines VLA-4, exprimées par les CSM, qui s'activent et se lient à VCAM-1 sur les cellules endothéliales (Rüster et al., 2006; Segers et al., 2006; Steingen et al., 2008).

Dans l'étape suivante appelée la transmigration ou la diapédèse, les CSM doivent se déplacer à travers la couche de cellules endothéliales et les membranes basales. Pour ce faire, les CStrom sécrètent des métalloprotéinases matricielles (MMP) qui brisent la membrane basale endothéliale (Steingen et al., 2008).

Enfin, les CStrom migrent à travers l'interstitium vers le site de la blessure. Les CStrom migrent vers divers signaux émis par les cellules environnantes, comme le facteur de croissance platelet-derived growth factor-AB (PDGF) ou l'insulin-like growth factor (IGF)-1, et dans une moindre mesure, les chimiokines RANTES, MDC et SDF-1 (Ponte et al., 2007). Une fois que les CStrom atteignent leur destination cible et se déposent dans les tissus, elles peuvent commencer à exercer leurs effets bénéfiques, notamment la régénération tissulaire, la modulation de la réponse inflammatoire locale et la promotion de la guérison.

Les CStrom jouent un rôle essentiel dans diverses thérapies médicales et ont suscité un intérêt croissant en raison de leur potentiel thérapeutique. Les CStrom sont une option thérapeutique pour la régénération tissulaire dans des conditions telles que les lésions osseuses, les fractures, les lésions musculaires, les problèmes articulaires et la cicatrisation des plaies. Les propriétés anti-inflammatoires

et immunomodulatrices en font un choix prometteur pour le traitement des maladies inflammatoires, telles que l'arthrite rhumatoïde et les maladies de l'intestin. Les CStroM peuvent aussi être utilisées pour stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) et pour améliorer la circulation sanguine dans les tissus ischémiques. Elles sont donc étudiées également pour le traitement des maladies cardiovasculaires, notamment après une crise cardiaque.

3.2. Les cellules souches hématopoïétiques

3.2.1. Classification

Comme mentionné dans la première partie de cette thèse, la preuve expérimentale qualitative de l'existence de cellules souches a été apportée par Till et McCulloch en 1961 ([Till & McCulloch, 1961](#)). Les CSH ont donc été les premières cellules souches mises en évidence.

Des tests *in vitro*, ont permis la mise en évidence, dans le sang ou la MO, de la capacité de prolifération ou de différenciation des progéniteurs hématopoïétiques. Les tests de clonogénicité ou tests CFC ou CFU-C (« Colony Forming Unit Cell ») sont des tests fonctionnels mettant en évidence la capacité proliférative et la multipotence des CSH mises en culture ([Majeti et al., 2007](#)). Le milieu utilisé dans ce test est un milieu semi-liquide (gélose semi-liquide, méthylcellulose, plasma) permettant la formation de colonies après 15 jours de culture. Ces colonies sont morphologiquement différenciables et peuvent être comptées.

Le développement des nouvelles technologies a permis de progresser sur la connaissance et la compréhension de la biologie des CSH. Une avancée majeure dans l'étude des CS est l'utilisation de marqueurs phénotypiques. Ces marqueurs sont des protéines de surfaces membranaires spécifiques aux différents stades de différenciation des CSH appelés clusters de différenciation (CD) ([Spangrude et al., 1988](#)). Le développement d'anticorps (Ac) dirigés contre ces CD et leur couplage à des fluorochromes a permis leur détection et leur sélection par cytométrie en flux.

Cependant, l'identité phénotypique exacte des CSH est encore inconnue et aucuns des marqueurs utilisés pour concentrer les CS n'est définitif et exclusivement lié à leur fonction. A ce jour, leur capacité d'auto-renouveaulement par le test de reconstitution de l'hématopoïèse chez des souris mortellement irradiées ou immunodéficientes (« SCID-Repopulating Cells », SRC) reste le « gold standard » pour leur détection. Le développement de souris immunodéprimées à partir de 1966 avec la découverte de la souris Nude ([Flanagan, 1966](#)) a permis de tester le potentiel de régénération des CSH. Les souris SCID (« Severe Combined Immunodeficiency ») et les souris NOD-SCID sont deux souches de souris

immunodéficientes utilisées et découvertes dans les années 1970 (Bosma & Carroll, 1991). La xénotransplantation est une technique qui consiste à transférer des tissus, des organes ou des cellules d'une espèce à une autre. L'utilisation de ces souris immunodéficientes combinées au test SRC permet d'évaluer la capacité des SCR humaines à rétablir l'hématopoïèse dans la MO d'un patient aplastique (Bhatia et al., 1998).

Sur la base des trois techniques décrites précédemment, il est maintenant possible de décrire le schéma hiérarchique du processus de différenciation hématopoïétique, comprenant à la base les CSH et leurs dérivés tels que les progéniteurs multipotents, les progéniteurs engagés, les précurseurs et les cellules différenciées (Weissman & Shizuru, 2008).

3.2.2. L'hématopoïèse

a. Définition

Les CSH jouent un rôle essentiel dans la régénération et le maintien de notre système sanguin. Ces cellules se distinguent par leur capacité unique à se différencier en divers types de cellules sanguines, notamment les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Leurs caractéristiques fonctionnelles assurent la production quotidienne, massive et continue de 10^{12} cellules sanguines matures durant un processus appelé l'hématopoïèse. Ce processus se déroule principalement dans la MO, bien que des étapes précoces puissent également avoir lieu dans le foie chez le fœtus (Weijts et al., 2021).

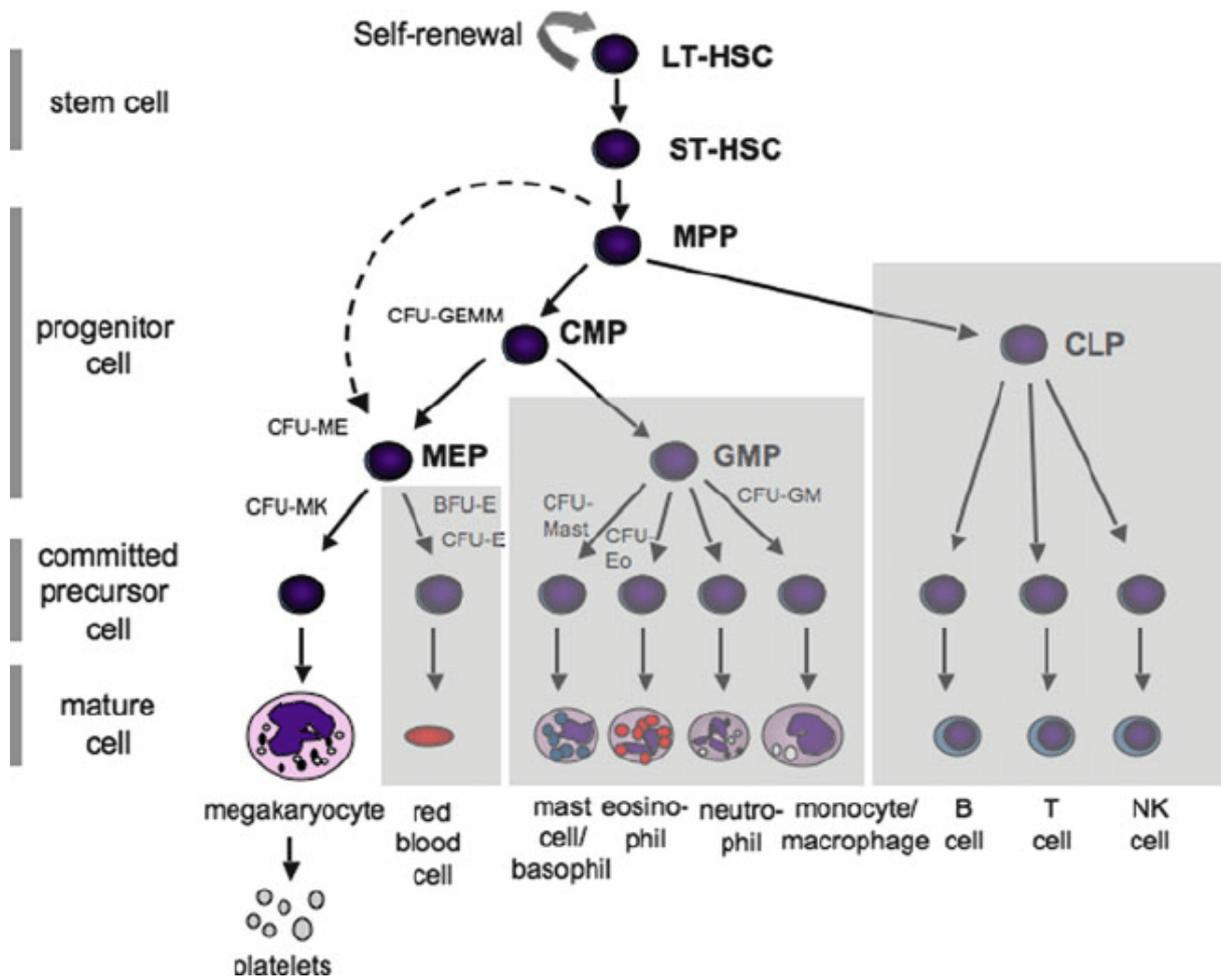


Figure 8. Représentation schématique de l'hématopoïèse. Diagramme schématisant la relation entre des populations progénitrices identifiables distinctes au cours de l'hématopoïèse. Les voies de différenciation non mégacaryocytaires sont ombrées. LT-HSC = long-term hematopoietic stem cell, ST-HSC = short-term hematopoietic stem cell, MPP = multipotent progenitor, CMP = common myeloid progenitor, GMP = granulocyte-macrophage progenitor, CLP = common lymphoid progenitor, MEP = megakaryocyte-erythroid progenitor, Mkp = megakaryocyte progenitor, CFU = colony-forming unit. Schéma tiré de l'article Adapté de Brunet de la Grange, 2004 et Guitart, 2009. Photos personnelles de colonies issues de différents progéniteurs CFC. Ce schéma est tiré de *Methods in molecular biology*, volume 788, Pages: 291-303, 2012 (M. Yu & Cantor, 2012). Cellule souche hématopoïétique à long terme LT-HSC, cellule souche hématopoïétique à court terme ST-HSC, progéniteur multipotent MPP, progéniteur myéloïde commun CMP, progéniteur granulocytes-macrophages GMP, progéniteur lymphoïde commun CLP, progéniteur mégacaryocytes-érythroïdes MEP, progéniteur mégacaryocytes Mkp, Unité formant colonie CFU.

b. Architecture

Durant l'hématopoïèse, les progéniteurs multipotents se développent phénotypiquement et fonctionnellement en précurseurs déterminés et morphologiquement reconnaissables (test CFU-C). En fonction des progéniteurs, différents types de colonies apparaissent et sont comptées, notamment les CFU-GM (colony-forming unit granulocyte macrophage) et les BFU-E (burst-forming units erythroid) (Akashi et al., 2000; Fauser & Messner, 1979). Cette différenciation implique une régression de la capacité d'auto-renouvellement et de prolifération des CSH les plus primitives. L'étape suivante est la

différenciation des progéniteurs oligopotents, communs à toutes les cellules de la lignée myéloïde (Common Myeloid Progenitor CMP; cellule/unité formant une colonie (granulocytes, érythrocytes, monocytes, mégacaryocytes, CFU-GEMM) (Akashi et al., 2000; Fauser & Messner, 1979). Du CMP naissent des cellules progénitrices communes aux lignées mégacaryocytaires et érythrocytaires, (Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor, MEP), à partir desquelles se développent les premiers progéniteurs exclusivement engagés dans la lignée érythrocytaire (Iwasaki & Akashi, 2007).

c. Régulation de l'hématopoïèse

Ce processus est finement régulé et contrôlé par diverses molécules comme des cytokines, des hormones, des facteurs de transcriptions ou encore des facteurs épigénétiques. Il peut, par exemple, être stimulé en réponse à des situations telles que des infections du fait de cytokines inflammatoires produites par diverses cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques, comme la thrombopoïétine (TPO), IL-3, stem cell factors (SCF), Flt3 ligand, interférons, TNF α , TGF β , IL-6, G-CSF et M-CSF (J. L. Zhao & Baltimore, 2015). Nous avons vu dans la partie sur les CStrom que ces dernières influencent grandement la quiescence et l'auto-renouveau des CSH par interactions adhésives ou bien par la sécrétion de molécules et peuvent donc réguler l'hématopoïèse.

L'hématopoïèse est donc essentielle pour maintenir un système sanguin fonctionnel tout au long de la vie.

En résumé, l'hématopoïèse est le mécanisme par lequel le corps génère et renouvelle constamment ses cellules sanguines pour assurer des fonctions vitales telles que le transport de l'O₂, la défense contre les infections et la prévention des saignements excessifs. C'est un processus complexe qui repose entièrement sur la présence de ces CSH. En plus d'être le soutien majeur de l'ensemble de la vie du tissu sanguin et donc de l'organisme, de par le renouvellement quasi quotidien des globules rouges, les CSH, comme vu pour les CSM, ont un rôle dans la régulation du système immunitaire. Elles sont responsables de la production de différents types de cellules immunitaires, notamment, les lymphocytes T et B, qui sont essentiels pour la défense de l'organisme contre les infections. Les CSH ont une importance clinique majeure dans le traitement de certaines maladies du sang, telles que la leucémie et l'anémie aplasique. Les transplantations de moelle osseuse, qui impliquent la greffe de CSH saines d'un donneur compatible, sont utilisées pour traiter ces affections et remplacer les cellules souches malades ou endommagées du patient (McKenzie et al., 2006).

3.2.3. Phénotype des CSH

Chez la souris les CSH ont tout d'abord été identifiées par les critères phénotypiques. Les CSH sont négatives pour le marqueur de lignage Lin (Lin-), expriment faiblement le Thy-1/CD90 et sont positives pour le marqueur Sca-1 et c-Kit. Le CD34 est le marqueur le plus connu pour isoler et purifier les CSH. Les cellules CD34+ sont à un stade très précoce de différenciation (Krause et al., 1996) et ont le potentiel de se développer en diverses cellules sanguines. Le CD34 est une phosphoglycoprotéine transmembranaire de type Sialomucine identifiée pour la première fois en 1984 (Civin et al., 1984).

Ainsi, les CSHs ont été regroupées dans une fraction cellulaire dénommée "LSK" (Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺) (Ikuta & Weissman, 1992; Spangrude et al., 1988). Les travaux ultérieurs ont montré que le compartiment LSK peut être subdivisé en deux populations de CSHs dites à long terme (Long Term [LT]-CSH) ou à court terme (Short Term [ST]-CSH). Les LT-CSH sont les plus immatures et elles sont appelées ainsi car elles ont la capacité de reconstituer l'hématopoïèse à long-terme après leur injection chez des souris irradiées. Les ST-CSH « court terme » sont révélées par une greffe dite primaire chez une première série d'animaux. Les LT-CSH « long terme » sont identifiées par une greffe secondaire utilisant les cellules issues de la première série d'animaux pour les greffer sur une seconde série. Cette greffe secondaire permet de mettre en évidence les cellules restées quiescentes et indétectables lors de la greffe primaire (Morrison & Weissman, 1994; Osawa et al., 1996; Randall et al., 1996).

Cependant les résultats récents relativisent cette découverte en montrant que ces deux populations ne sont pas vraiment distinctes fonctionnellement (L. Liu et al., 2012). Il est important de rappeler que les CSH « réels » sont une population rare, la fréquence de ces cellules primitives est estimée à seulement 1 sur 10⁴-10⁵ dans la MO (Martin-Rendon & Watt, 2003).

Ces marqueurs phénotypiques ont malgré tout permis d'obtenir des populations enrichies en CSH. Il s'agit donc, le plus souvent, d'une population hétérogène sur le plan fonctionnel (Zipori, 2004).

4. LA NICHE HEMATOPOIETIQUE : MICROENVIRONNEMENT DES CSH ET CStrom DANS LA MOELLE OSSEUSE

Dans le corps humain, l'organe le plus mou de tous, le sang, est ironiquement produit par l'organe le plus dur : le squelette. Les CSH se trouvent dans cette moelle osseuse dans des compartiments spécialisés appelés niches hématopoïétiques, constituant un sanctuaire pour les CS qui s'y trouvent. Ce microenvironnement essentiel régule de nombreuses activités des cellules souches, notamment l'auto-renouvellement, la mobilisation, la prise de greffe et la différenciation des lignées (Spradling et

al., 2001). Les CSH résident dans la niche située près de l'endoste de la cavité médullaire et sont supportées par de nombreux types cellulaires comme les CSM. Lors de la découverte des CSM, comme déjà évoqué, Friedenstein (Friedenstein et al., 1970) a constaté que les CSM injectées sous la capsule rénale, produisant des tissus fibreux de l'os ou des trabécules osseux, forment des foyers d'hématopoïèse dont, les cellules hématopoïétiques issues du receveur. Ces observations ont suggéré l'existence d'une niche pour les CSH circulantes qui trouvent des sites d'ancrage et de développement favorables dans des colonies issues des CFU-F.

Par la suite, le concept de la niche hématopoïétique a été proposé pour la première fois par Raymond Schofield en 1978. Il décrit le fait que la niche des CSH représente un microenvironnement physiologiquement limité qui détermine leur physiologie (Schofield, 1978). Ce microenvironnement est séparé en plusieurs sous-parties qui définissent plusieurs « types de niches ». La niche endostéale (ostéoblastique) est située près de l'endoste où la concentration en O₂ peut être extrêmement basse, située loin des vaisseaux (Chow et al., 2001a, 2001b). La niche vasculaire, à proximité immédiate des vaisseaux sanguins où les CS se trouvent dans un environnement plus oxygéné, aux alentours des 4% (Spencer et al., 2014). L'état actuel des connaissances concernant la contribution de ces deux niches montre que la niche endostéale est probablement un réservoir à long terme de CSH qui protègerait et garderait ces cellules en état quiescent (Trumpp et al., 2010) et où la basse concentration en O₂ jouerait un rôle primordial dans cette quiescence (Winkler et al., 2010). La niche vasculaire elle, plus riche en O₂, nutriments et cytokines de par la proximité avec les vaisseaux sanguins, favoriserait plutôt la prolifération et la différenciation (Avecilla et al., 2004) pour permettre la mobilisation des CSH dans la circulation sanguine une fois mature (Kopp et al., 2005).

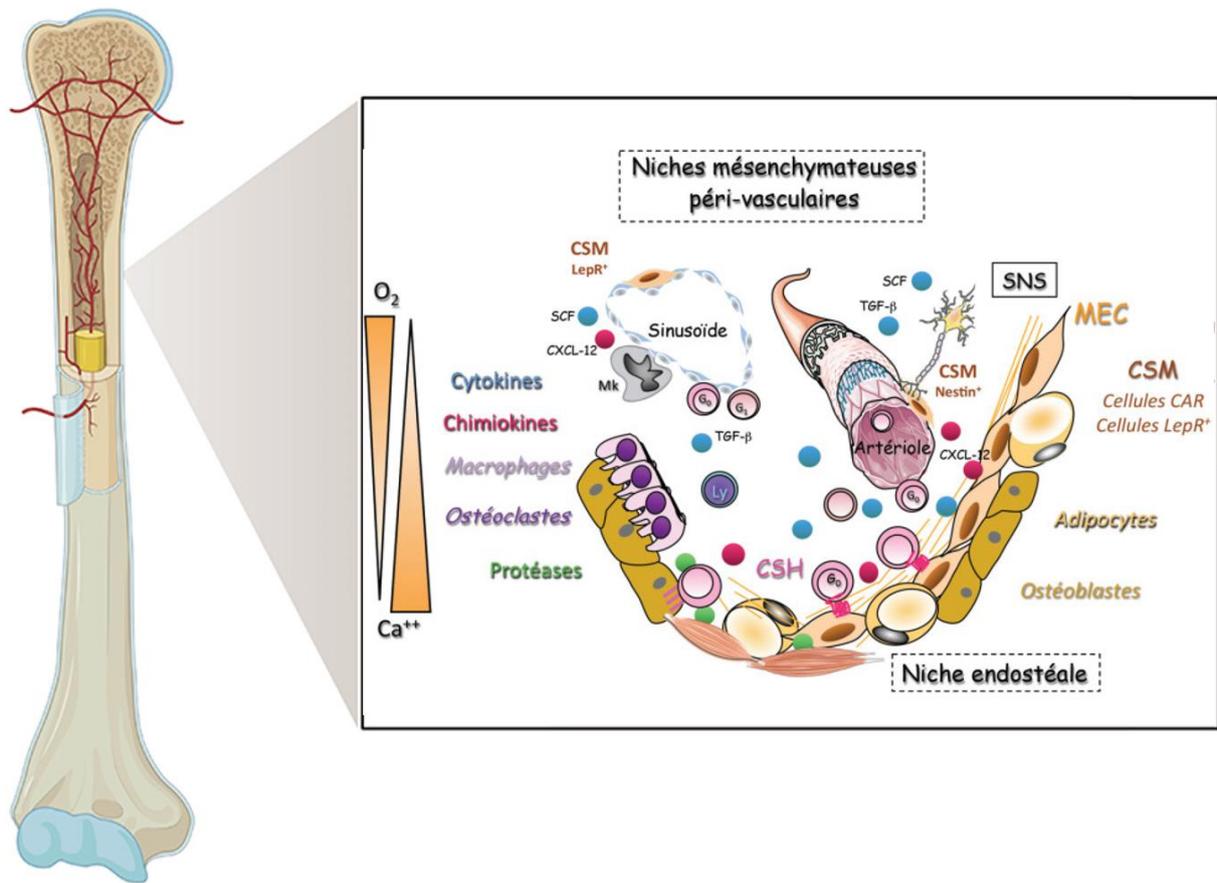


Figure 9. Schéma de la composition de la niche hématopoïétique de la moelle osseuse. Schéma modifié à partir des articles « Aspects cellulaires et régulation cytokinique » (Yahmi et al., 2022) et « Physiopathologie des néoplasies myéloprolifératives ; quand le microenvironnement s'enflamme ! » (Martinaud et al., 2017).

La niche est constituée de plusieurs types cellulaires, d'une matrice extracellulaire (MEC) et de facteurs solubles. La description de l'environnement permettant le maintien des fonctions souches des CSH et CStroM est importante mais la régulation qui nous intéresse le plus pour la suite de ce travail et qui traite de la basse concentration en O_2 de la niche sera discutée dans le second chapitre de cette thèse.

Le composant cellulaire comprend des cellules non hématopoïétiques et des ostéoblastes, des réticulocytes, des adipocytes et des CStroM (WILKINS & Jones, 1995), ainsi que des cellules hématopoïétiques comme des cellules immunitaires de type macrophages, lymphocytes et monocytes, et enfin des ostéoclastes et cellules endothéliales (CE). Le rôle des CStroM comme soutien à la fonction des CSH dans la niche a déjà été discuté en amont. Il est important de noter que les CSM sont parmi les composants critiques qui participent à la création du microenvironnement nécessaire à l'hématopoïèse et à la régulation des CSH (Kiel & Morrison, 2008).

CHAPITRE 2 : METABOLISME BIOENERGETIQUE CHEZ L'HUMAIN

Avant de parler du métabolisme bioénergétique des CS, nous allons d'abord faire un rappel et définir les principales voies bioénergétiques des cellules humaines.

Le métabolisme est l'ensemble des réactions chimiques qui se produisent dans les cellules d'un organisme vivant, permettant le maintien de la vie. Il comprend deux catégories principales de processus : le catabolisme, qui est la phase de dégradation de la matière permettant la création d'énergie, et l'anabolisme qui est la phase de construction de la matière par l'utilisation de l'énergie fournie par le catabolisme. L'homéostasie entre le catabolisme et l'anabolisme est essentielle pour la survie de l'organisme, car ces processus permettent de convertir les nutriments en énergie, de construire et de réparer les tissus, et de maintenir toutes les fonctions cellulaires essentielles. En fin de compte, le métabolisme est au cœur de la régulation de la vie et du fonctionnement des organismes vivants.

La principale forme d'énergie produite lors du catabolisme est l'adénosine triphosphate (ATP). L'énergie libérée par l'hydrolyse des liaisons phosphoanhydrides de l'ATP permet d'alimenter la majorité des processus biochimiques nécessaires à la vie. L'ATP est générée par divers mécanismes, à la fois aérobies et anaérobies, qui permettent aux organismes de couvrir une partie de leurs besoins énergétiques dans des conditions variables. Les processus dits aérobies nécessitent de l' O_2 pour fonctionner. Un organisme aérobique est un être vivant dont la voie métabolique de production d'énergie peut utiliser l' O_2 comme accepteur d'électron. Par opposition, il existe des organismes produisant de l'énergie et pouvant subsister sans O_2 . Ces conditions ne sont pas essentiellement des conditions strictes. Ces systèmes sont, comme tout système biologique, régulés et adaptables. Certains organismes sont des microaérophiles, ils ont besoin d' O_2 , mais ne peuvent survivre à des concentrations trop élevées.

Nous allons maintenant rappeler et détailler les principales voies du métabolisme cellulaire humains.

1. Le métabolisme anaérobie

1.1. La glycolyse

1.1.1. Description de la voie

Le glucose est la source carbonée principale des cellules dans la majorité des organismes vivants. Chez les animaux, le glucose provient des glucides digérés dans l'intestin, ou de l'hydrolyse du glycogène

dans le foie. Tout d'abord, le glucose est transporté du flux sanguin à travers la membrane plasmique (MP) de la cellule via des transporteurs bidirectionnels nommés GLUT dont quatorze isoformes ont été identifiées dans les cellules humaines (Thorens & Mueckler, 2010). Parmi ces isoformes, seules cinq d'entre elles (GLUT1 à GLUT5) ont été caractérisées en termes de transport. L'expression de certaines de ces isoformes, présentant des caractéristiques cinétiques distinctes, dépend principalement de la spécificité fonctionnelle des tissus. Tandis que GLUT1 et GLUT3 sont présents dans tous les tissus des mammifères, GLUT2 est principalement exprimé dans les hépatocytes, les cellules β des îlots de Langerhans, et les cellules de la membrane basolatérale de l'intestin grêle (Kaunitz, 1991). GLUT4 est spécifiquement exprimé dans les tissus cibles de l'insuline, tels que le muscle squelettique et le tissu adipeux. GLUT5 présente une affinité accrue pour le fructose par rapport au glucose. Il a été initialement caractérisé dans des entérocytes et des spermatozoïdes (Burant et al., 1992). Le transport du glucose à travers les perméases s'effectue selon le principe de diffusion facilitée. En se basant sur le gradient de concentration, ces transporteurs facilitent le déplacement du glucose du côté le plus concentré (milieu extracellulaire) vers le côté moins concentré (cytoplasme). Ce gradient de concentration est maintenu grâce à l'importation du glucose, qui est immédiatement phosphorylé par une hexokinase pour former le glucose-6-phosphate (G6P). Cette réaction constitue la première étape d'un ensemble de 10 réactions appelé glycolyse (Cori, 1983; Embden et al., 1933). Cette voie métabolique ne nécessite pas d'O₂ et décompose la molécule de glucose en deux molécules carbonées plus petite : le pyruvate. (Figure 10).

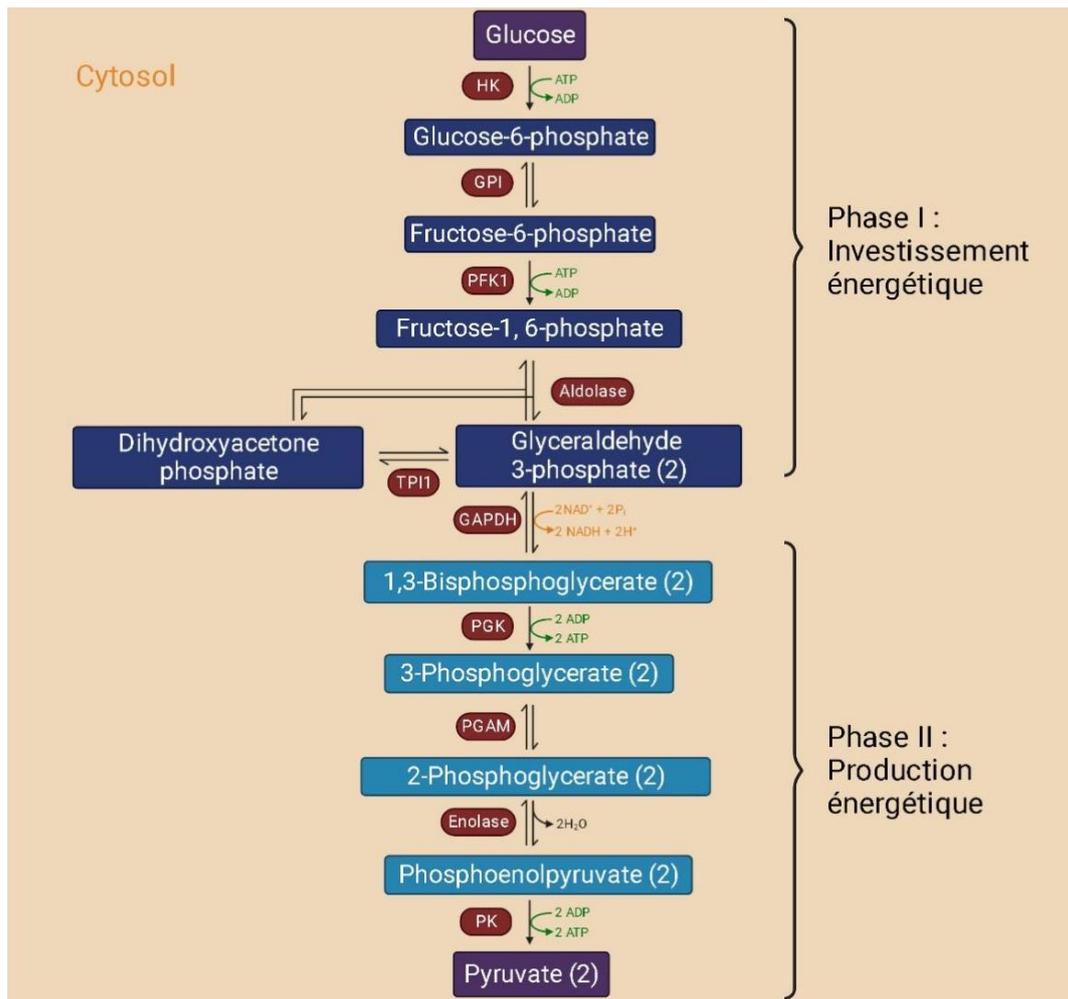


Figure 10. Schéma de la glycolyse. La voie de la glycolyse peut être divisée en deux parties (I) le glucose est capturé par l'ajout du groupement phosphate puis déstabilisé en deux composés à trois atomes de carbones. Cette phase représente la phase d'investissement énergétique, en consommant deux ATP (II) L'étape finale de la glycolyse est la formation de pyruvate, intermédiaire métabolique important et les molécules d'ATP sont produites. Cette dernière partie est la phase de production énergétique avec la production de 4 ATP. Le bilan global de la glycolyse est donc de deux ATP.

Elle est divisée en deux phases distinctes. Dans la première phase les enzymes hydrolysent la molécule de glucose en deux molécules de glycérol 3-phosphate (G3P). Ces réactions utilisent deux molécules d'ATP pour le fonctionnement des enzymes catalysant la première et la troisième réaction, respectivement l'hexokinase (HK) et la phospho-fructokinase 1 (PFK1). Dans la seconde phase, les deux molécules de G3P sont métabolisées en deux molécules de pyruvate, et génèrent 4 molécules d'ATP sous l'action des enzymes phospho-glycérate kinase et pyruvate kinase. La glycolyse produit donc deux molécules d'ATP et deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) sous une forme réduite (NADH), un coenzyme essentiel dans les réactions d'oxydoréductions.



1.1.2. La régulation de la glycolyse

Les réactions énergétiques sont finement régulées dans l'ensemble de la cellule afin de maintenir l'homéostasie cellulaire mais permettent aussi aux cellules de s'adapter face aux dérèglements pouvant être provoqué par des pathogènes ou des perturbations environnementales.

En thermodynamique, l'énergie libre de Gibbs, G , est l'énergie associée à une réaction chimique qui peut être utilisée pour effectuer un travail à température et pression constantes. La variation de l'énergie libre de Gibbs, ΔG , pour une réaction à une certaine température, détermine la spontanéité de la réaction à cette température. Si elle est négative, le processus est spontané et peut se dérouler selon la thermodynamique. Une réaction avec une valeur ΔG négative est appelée une réaction exergonique. Si elle est positive le processus n'est pas spontané. Une réaction avec une valeur ΔG positive est appelée une réaction endergonique.

La glycolyse comporte trois étapes clés de régulation (1, 3 et 10) catalysées par l'HK, la PFK1 et la pyruvate kinase (PK). Celles-ci ont de grandes valeurs ΔG négatives et sont essentielles pour diriger le flux global vers le pyruvate. Ces trois réactions sont irréversibles et essentielles dans la régulation de la voie glycolytique. Elles peuvent être impactées par de nombreux paramètres tels que les métabolites produits qui peuvent agir de manière allostérique. Des voies de signalisation peuvent aussi entraîner des modifications des enzymes (phosphorylation ou acétylation) ou encore des modifications de la concentration en enzyme qui est contrôlée par voie transcriptionnelle, entre autres. Les hormones métaboliques, insuline et glucagon, régulent également les voies métaboliques dépendantes du glucose (C. Wu et al., 2005).

L'HK catalyse la première étape de la glycolyse et produit du G6P en utilisant de l'ATP. Il en existe quatre isoformes chez les mammifères (Katzen & Schimke, 1965) et leurs propriétés fonctionnelles diffèrent considérablement. L'isoforme I (HKI) régit l'étape limitante de la glycolyse dans le cerveau et les globules rouges (Lowry & Passonneau, 1964; Rapoport, 1968). Cette enzyme est sensible à la concentration en G6P et son accumulation entraîne un arrêt de la phosphorylation du glucose. Cette étape de régulation fait que le glucose et l'ATP (dans les réactions 1 et 3) ne sont pas engagés dans la glycolyse, sauf si cela est nécessaire. Ce n'est cependant pas le cas dans les cellules hépatiques qui expriment une isoenzyme de l'HK appelée glucokinase qui n'est pas inhibée par le G6P et qui dirige le flux vers la formation du glycogène (Ferre et al., 1996). La glycémie moyenne chez les humains non diabétiques est généralement d'environ 5 mM, mais peut augmenter jusqu'à 8 mM après un repas riche en glucides. La glucokinase, abondante dans le foie, ayant une V_{max} élevée, élimine efficacement

le glucose du sang pour minimiser l'hyperglycémie (C. Wu et al., 2005). En raison du K_m élevé de la glucokinase, son activité enzymatique diminue lorsque le taux de sucre dans le sang descend en dessous de 6 mM.

La PFK utilise l'ATP pour phosphoryler le fructose-6-phosphate (F6P) en fructose-1,6-bisphosphate (F1,6BP) et est régulée par plusieurs métabolites. Trois isoformes chez les mammifères sont retrouvées en proportion dépendante du besoin spécifique en métabolisme énergétique (Al Hasawi et al., 2014). PFK-M est retrouvé dans le muscle, PFK-P dans les plaquettes, fibroblastes et lymphocytes et PFK-L dans le foie. PFK-1 est soumise à une régulation allostérique par un certain nombre de molécules (à savoir le fructose-2,6-bisphosphate, l'AMP, l'ATP, le citrate, etc.). En excès, l'ATP est capable d'inhiber de manière allostérique la PFK en se liant à une région distincte de son site catalytique, provoquant la perte d'affinité de l'enzyme pour le F6P (Zancan et al., 2007). Cette inhibition peut être renforcée par le citrate, un produit intermédiaire du cycle de Krebs. Cela ralentit la glycolyse et empêche une accumulation supplémentaire de pyruvate. Une baisse du pH inhibera également la PFK, afin d'éviter un excès de production de lactate et sa libération dans la circulation sanguine. L'adénosine monophosphate (AMP) a l'effet inverse de l'ATP. L'effet sur la PFK est dû au fait que lorsque l'ATP est rare, l'ADP sera convertie en ATP et AMP par l'adénylate kinase. L'AMP est donc le véritable indicateur final de l'épuisement énergétique de la cellule. En conséquence, cela stimulera la glycolyse via la PFK.

La PK catalyse la conversion du phosphoenolpyruvate en pyruvate, combinée à la phosphorylation de l'ADP pour former de l'ATP. Il existe quatre isoformes de pyruvate kinase chez les mammifères (PKM1, PKM2, PKR, PKL) (Imamura & Tanaka, 1982). La plupart des tissus adultes expriment PKM2 (Cardenas & Dyson, 1978). L'isoforme PKM1 se trouve dans les tissus à forte demande catabolique, tels que les muscles, le cœur et le cerveau. La PKL est l'isoforme majeure dans le foie et une isoforme mineure dans le rein, qui exprime également PKM2. La PKR se trouve exclusivement dans les globules rouges. Les deux isoenzymes sont inhibées lorsque les produits en aval s'accumulent, comme l'ATP et l'alanine, un produit du cycle de Cahill et de la formation d'acides aminés dans les hépatocytes (Morgan et al., 2013). Cependant, lorsque la glycémie est basse, la PKL est phosphorylée par la protéine kinase A et inhibée. Cela diminuera la glycolyse uniquement dans le foie, de sorte à ce que le reste des quantités de glucose dans le sang puissent être métabolisées par les organes qui en ont le plus besoin, comme le cerveau et muscles.

En plus de générer de l'ATP, les intermédiaires glycolytiques sont reliés à de nombreuses voies de biosynthèses et d'oxydations métaboliques. (Figure 11).

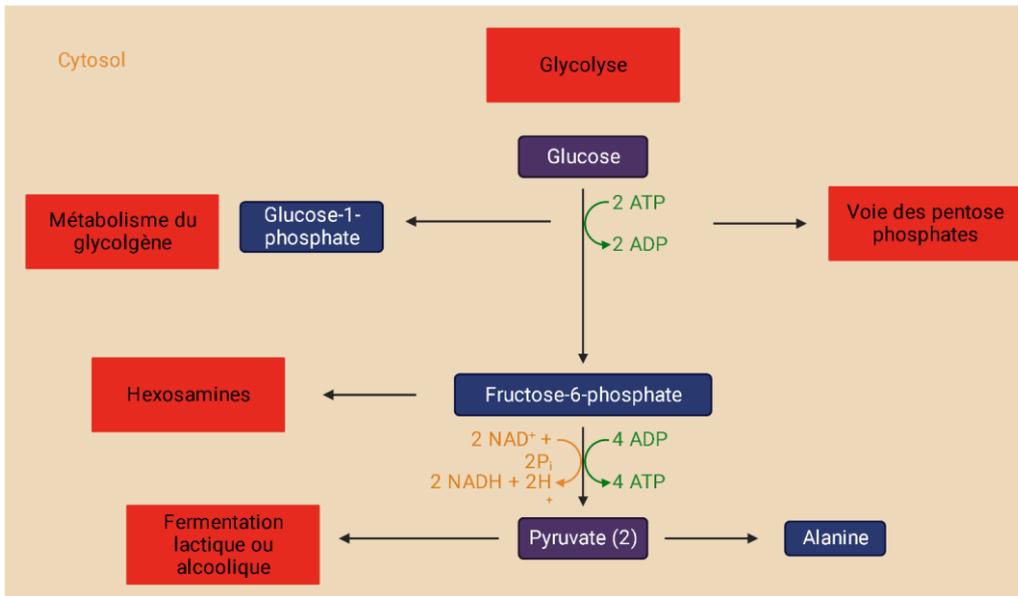


Figure 11. Schéma simplifié de la glycolyse et de ses voies interconnectées.

1.2. La fermentation lactique

En absence d'oxygène, le rôle majeur de la glycolyse est de fournir l'ATP nécessaire à la survie. Dans ce cas-là, le pyruvate est réduit en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) et cette réaction est couplée à l'oxydation du NADH en NAD⁺ (Figure 12).

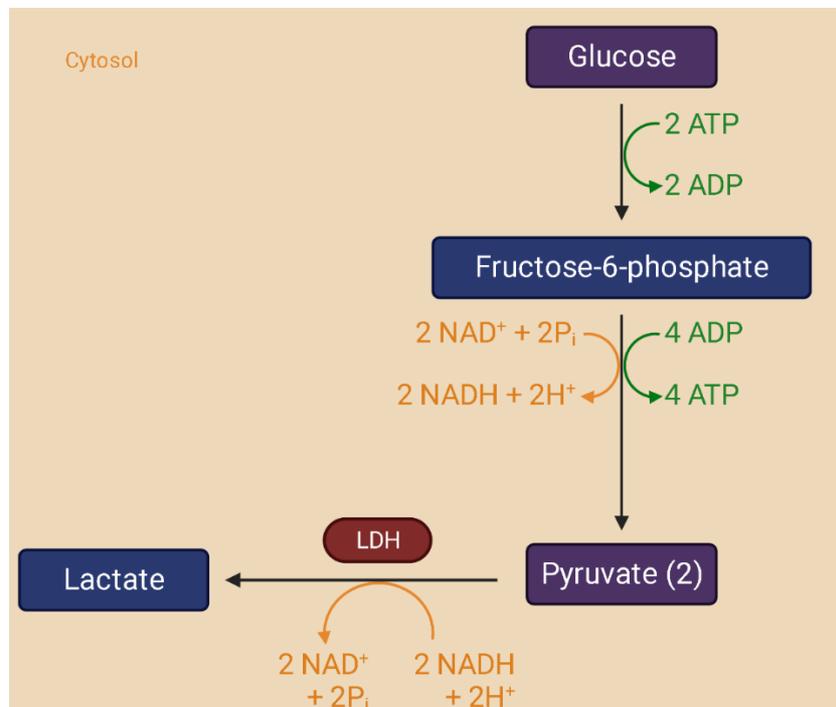


Figure 12. Schéma de la fermentation lactique ou glycolyse anaérobie à partir du schéma de la glycolyse simplifiée. Le glucose oxydé en deux molécules de pyruvates. Les molécules de pyruvate réagissent avec la lactate déshydrogénase pour former du lactate. Cette dégradation n'utilise pas d'oxygène, produit 2 ATP et régénère le NAD.

Beaucoup d'entre nous connaissent une accumulation de lactate lors d'un exercice vigoureux (Goodwin et al., 2007). Dans ces conditions, l'O₂ ne peut pas être délivré aux mitochondries musculaires pour répondre aux demandes métaboliques élevées imposées aux cellules musculaires. En l'absence d'oxygène, la chaîne de transport d'électrons ne peut pas régénérer le NAD⁺, ce qui rend la réaction de la LDH essentielle à la régénération du NAD⁺ et au flux continu par la glycolyse. Cette voie métabolique est appelée glycolyse anaérobie ou fermentation lactique. De nombreux eucaryotes sont des aérobies obligatoires : ils ne poussent qu'en présence d'oxygène. Cependant, la plupart des eucaryotes peuvent générer un peu d'ATP par le métabolisme anaérobie. Quelques eucaryotes sont des anaérobies facultatifs : ils poussent soit en présence ou en l'absence d'oxygène. Par exemple, des vers, des mollusques, et certaines levures peuvent vivre et croître pendant des jours sans O₂.

1.3. La voie des pentoses phosphates (PP)

La voie des PP est étroitement liée à la glycolyse, par de nombreuses enzymes et intermédiaires communs (Figure 13). La formation des PP est initiée par le G6P qui résulte de la première réaction catalysée par l'HK glycolytique. La voie des PP peut être divisée en deux branches : la branche oxydative et la branche non oxydative. Le G6P est oxydé en 6-phosphogluconolactone puis en 6-phosphogluconate et enfin en ribulose-5-phosphate. Ce processus réduit deux molécules oxydées de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Le ribose-5 P entrera alors dans la voie des PP non-oxydante sous forme de ribose-5-phosphate ou de xylose-5-phosphate. Ce dernier peut de nouveau être engagé dans la glycolyse en formant du fructose-6-phosphate ou du G3P.



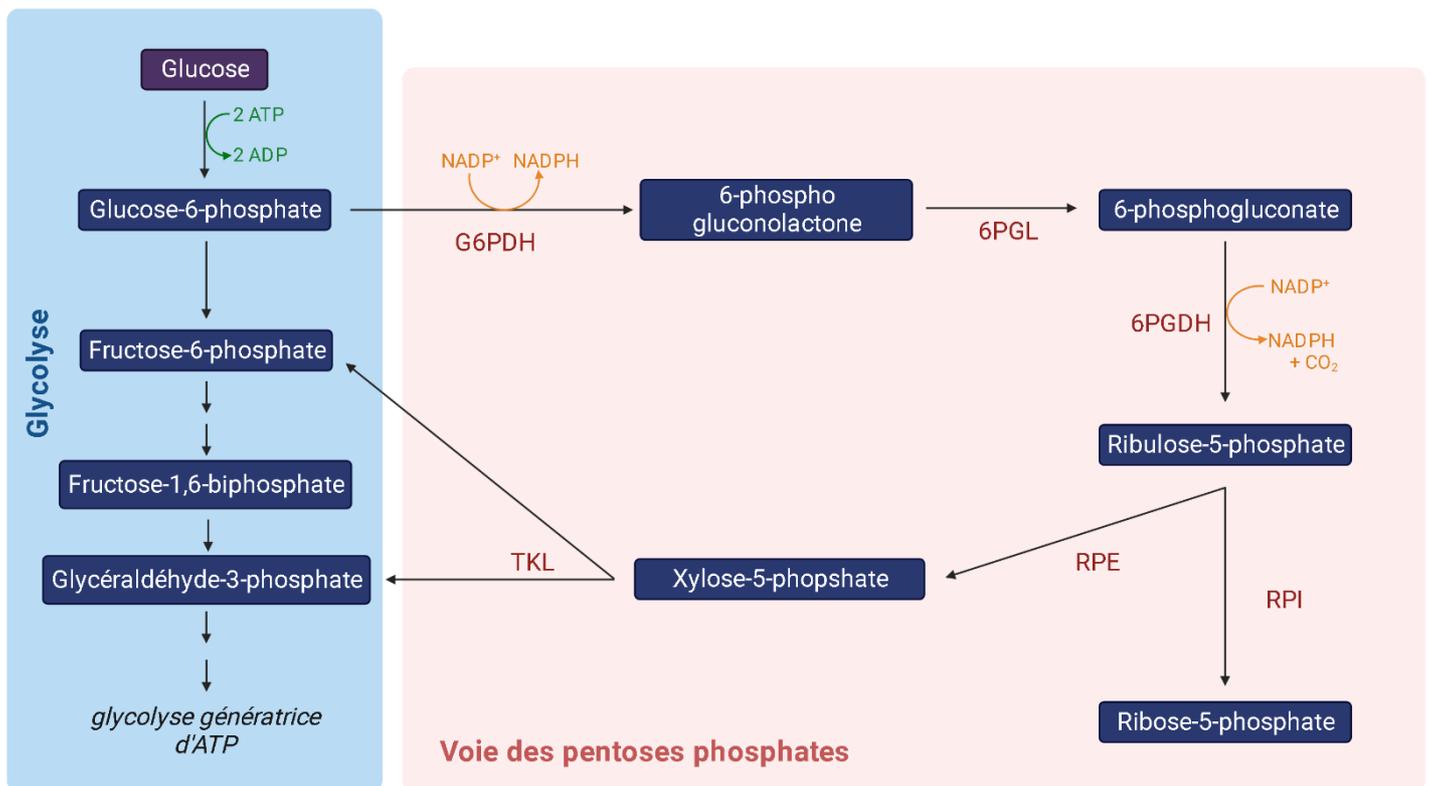


Figure 13. Schéma de la voie des PP. Elle permet la formation de ribose-5-phosphate à partir d'un intermédiaire de la glycolyse le G6P et la production de NADPH nécessaire aux réactions de détoxication des ROS (Ion superoxyde, O_2^- ; radical hydroxyle, OH^\cdot ; ion hydroxyle, OH^- ; peroxyde d'hydrogène, H_2O_2).

Les fonctions de la voie des PP sont variées, et l'une des plus étudiées est sa capacité anti-oxydante à travers sa production de NADPH. La réduction du NADPH permet à la cellule de contrer le stress oxydatif en activant les systèmes thiorédoxine/peroxirédoxine et glutathion (Pollak et al., 2007). Lorsque la cellule est exposée à des facteurs oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'activité de la voie des PP augmente en réponse à une surexpression des enzymes de la voie et à des modifications post-traductionnelles (Cosentino et al., 2011; Y.-P. Wang et al., 2014). En parallèle, la glycolyse est inhibée par la G6PDH et la PK (Anastasiou et al., 2011; Grüning et al., 2011; Ralser et al., 2007).

1.4. La gluconéogenèse

La gluconéogenèse est le processus métabolique de régulation de la concentration de glucose. Les premières investigations sur la gluconéogenèse ont révélé que cette voie métabolique se déroule principalement dans le cytosol et les mitochondries du foie, des reins et des muscles. Son rôle dans ces types de cellules est de maintenir une concentration constante de glucose dans le sang. En quelque

sorte, elle peut être considérée comme l'opposée de la glycolyse, car de nombreuses enzymes sont partagées entre les deux voies, mais elles agissent en sens inverse. Les différences majeures se situent au niveau des trois étapes régulatrices de la glycolyse, impliquant les enzymes HK, PFK et PK. Dans la gluconéogenèse, l'HK est remplacée par la glucose-6-phosphatase, la PFK par la fructose-1,6-bisphosphatase, et la PK par la pyruvate carboxylase et la PEP carboxykinase. Cela ajoute une quatrième étape irréversible à cette voie, nécessitant la consommation de 6 ATP par molécule de glucose dans le processus (voir figure14).

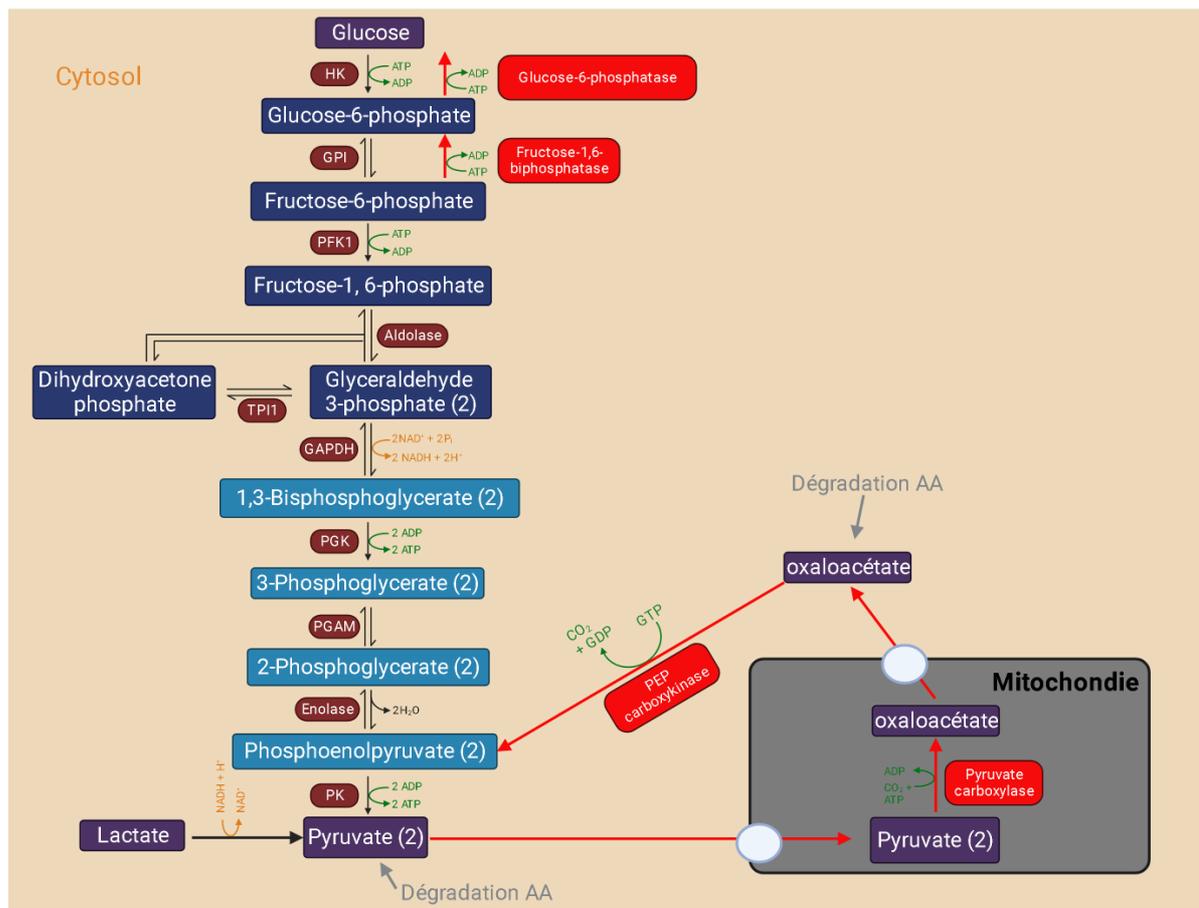


Figure 14. Schéma de la gluconéogenèse. Elle permet la formation de glucose. C'est la réaction inverse de la glycolyse, à ceci près qu'ici les enzymes irréversibles de la glycolyse sont remplacées par d'autres enzymes consommant plus d'ATP.

Chez les humains, plusieurs voies métaboliques contribuent à alimenter la gluconéogenèse en pyruvate. Lors d'un exercice intense, les muscles produisent du lactate par glycolyse anaérobie, qui est ensuite libéré dans la circulation sanguine par le transporteur monocarboxylate 1 (MCT1). Pour éviter une accumulation excessive de lactate dans le sang (acidose), le foie l'absorbe via MCT1, le transforme en pyruvate grâce à la LDH, puis utilise ce pyruvate pour générer du glucose par gluconéogenèse. Ce glucose est ensuite utilisé par les muscles comme source d'énergie. Ce processus énergétiquement

coûteux, appelé cycle de Cori, nécessite 4 ATP par molécule de glucose, mais il est essentiel pour fournir de l'énergie aux muscles lors d'un effort intense (Katz & Tayek, 1999). En plus de l'exercice, une autre source de lactate pour le cycle de Cori provient des érythrocytes, qui n'ont pas de mitochondries. Un processus similaire entre les cellules musculaires et hépatiques est effectué par le cycle de Cahill, également connu sous le nom de cycle glucose-alanine. Ce mécanisme permet de traiter les déchets azotés produits par la dégradation des acides aminés à chaîne ramifiée dans les muscles. L'alanine est produite lorsque le groupe ammonium du glutamate est transféré au pyruvate par l'alanine aminotransférase (ALT). L'alanine est ensuite transportée vers le foie, où elle est reconvertie en pyruvate par la même enzyme AST. Ce pyruvate peut alors être utilisé dans la gluconéogenèse pour produire du glucose, qui est ensuite renvoyé aux muscles pour une production ultérieure d'ATP. L'ammonium libéré dans le foie grâce à l'AST est ensuite éliminé du corps par le cycle de l'urée.

1.5. Autres voies cytosoliques non dépendantes de l'O₂

Le F6P sert de plaque tournante pour le rattachement à la voie des hexosamines qui permet de générer des sucres aminés pour la synthèse de glycoprotéines, glycolipides, et de protéoglycanes. Ces voies sont réversibles et les hexosamines peuvent alimenter la glycolyse quand cela est nécessaire. Le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) peut être converti en glycérol 3-phosphate pour générer des lipides. Le 1,3-bisphosphoglycérate (1,3-BP) génère du 2,3-bisphosphoglycérate (2,3-BP), un régulateur allostérique de l'hémoglobine, dans les globules rouges. Le 3-phosphoglycérate (3-PG) peut être converti en sérine, un précurseur pour la synthèse des acides aminés cystéine et glycine. Le pyruvate peut générer l'acide aminé alanine.

Le G6P peut aussi servir au stockage des sucres sous la forme de glycogène. Il participe à la première étape de la néo-gluconéogenèse (Figure 11).

2. Le métabolisme aérobie

En présence d'oxygène, le pyruvate formé est transporté dans les mitochondries, où il va y subir un ensemble de réaction oxydative appelée respiration cellulaire. Ces réactions génèrent environ 28 molécules d'ATP supplémentaires par molécule de glucose, dépassant de loin le rendement en ATP de métabolisme anaérobie du glucose.

2.1. La mitochondrie

La mitochondrie représente la clé de voute de la production énergétique aérobie. Cette organelle endosymbiotique (Chapitre 3) permet aux cellules humaines de produire efficacement de grandes quantités d'ATP par utilisation de l' O_2 comme accepteur final d'électrons d'une série de réactions d'oxydoréduction de la matrice mitochondriale et au niveau de sa membrane interne. Elles jouent aussi un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme cellulaire. Elles sont sensibles aux signaux métaboliques et aux besoins énergétiques de la cellule.

La mitochondrie a une structure complexe composée de deux membranes : une membrane externe et une membrane interne. L'espace entre ces deux membranes est appelé l'espace intermembranaire. La membrane interne est fortement plissée pour former des structures appelées crêtes mitochondriales, qui augmentent la surface disponible pour les réactions bioénergétiques qui s'y passent. La mitochondrie est souvent décrite comme la "centrale énergétique" de la cellule en raison de sa fonction principale dans la production d'ATP. Dans cette membrane interne mitochondriale se trouve la chaîne respiratoire, véritable usine de production énergétique. Les électrons produits lors de la dégradation des nutriments (glucose, acides gras, etc.) sont transportés le long de la chaîne respiratoire, générant un gradient électrochimique. Ce gradient est ensuite utilisé pour synthétiser de l'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi) grâce à l'ATP synthase présente également sur la membrane interne mitochondriale.

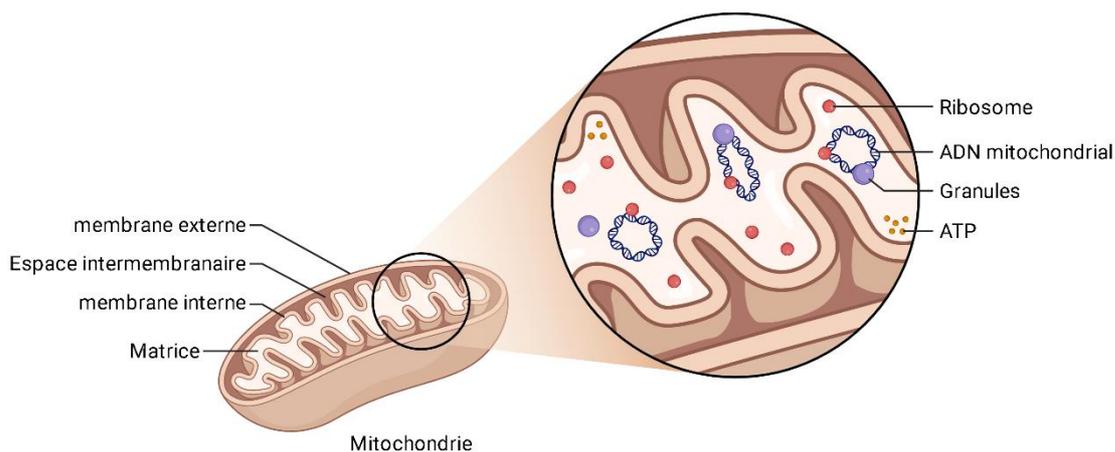


Figure 15. Schéma de la structure mitochondriale. Représentation des compartiments mitochondriaux comprenant une double membrane (externe et interne) délimitant l'espace intermembranaire. A l'intérieur de la membrane interne, dans la matrice mitochondriale se trouve de l'ADN et des ribosomes mitochondriaux. Cet organe présente dans les cellules animales et végétales et capable d'assurer la respiration cellulaire et la mise en réserve de l'énergie.

En présence d'oxygène (de 3 à 30 μM) (M. P. Murphy, 2009), le pyruvate et le NADH sont transportés dans les mitochondries, où le pyruvate entre dans le cycle de Krebs (Figure 16) tandis que le NADH est oxydé en NAD^+ par la chaîne de transport d'électrons (Figure 17) et ramené dans le cytosol pour favoriser la glycolyse.

Chez la levure, la drosophile et l'humain, deux protéines transporteurs de type MPC pour « mitochondrial pyruvate carrier » ont été identifiées comme essentielles pour le passage du pyruvate vers la matrice mitochondriale (Bricker et al., 2012).

Dans la matrice mitochondriale, le pyruvate est recruté par le complexe enzymatique pyruvate déshydrogénase qui catalyse la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA. La pyruvate déshydrogénase est un gros complexe multienzymatique accroché à la face matricielle de la membrane interne de la mitochondrie. Il regroupe trois activités enzymatiques : la pyruvate déshydrogénase, la dihydrolipoyl transacétylase et la dihydrolipoyl déshydrogénase. La conversion du pyruvate en acétyl-CoA par ce complexe est réalisée en plusieurs étapes, elle nécessite l'implication de plusieurs coenzymes : le thiamine pyrophosphate (TPP), le lipoamide, la flavine adénine dinucléotide (FAD), le NAD^+ et le coenzyme A (CoA). Ce dernier sera recyclé à la fin de la 2^{ème} étape du cycle qui va être décrit dans la partie suivante.

Pour ce faire, la cellule transporte le pyruvate du cytosol à travers les membranes mitochondriales jusqu'à la matrice via la Pyruvate translocase, un symport qui transporte en même temps, dans la même direction, un proton H^+ . Une fois transporté, il réagit avec le coenzyme A, formant du CO_2 et l'acétyl-CoA. Le complexe enzymatique appelé "pyruvate déshydrogénase (PDH)" est responsable de la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA. Notons que la PDH peut être régulée par la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) (Milne, 2013).

2.2. Le cycle de Krebs

Hans Krebs a synthétisé des recherches étalées sur plusieurs années pour offrir une meilleure compréhension du cycle de Krebs, également connu sous le nom de cycle de l'acide citrique (Krebs, 1940) (Figure 16).

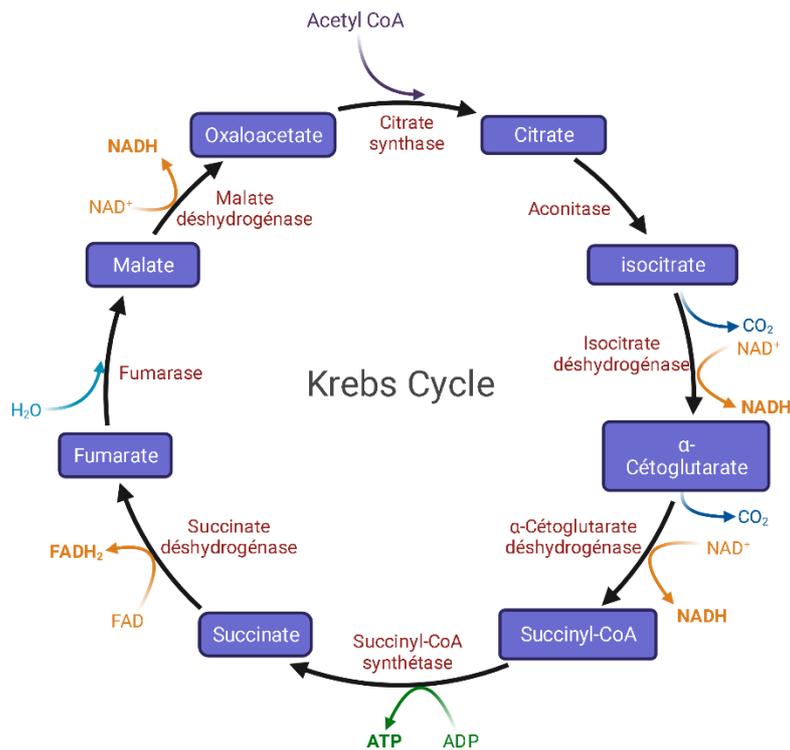


Figure 16. Schéma du cycle de Krebs.

Après l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie et sa transformation en acétyl CoA se dernier entre dans le cycle de Krebs qui débute avec la citrate synthase qui convertit l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate en citrate, une réaction entraînant la réduction du NAD^+ et la production de CO_2 . Cette enzyme est fortement régulée, notamment par le NADH et le succinyl-CoA. L'aconitase intervient pour convertir le citrate en isocitrate, suivi d'une décarboxylation oxydative de l'isocitrate par l'isocitrate déshydrogénase, générant ainsi de l' α -cétoglutarate et du NADH (Stobbe et al., 2012). Ce NADH sera transféré vers la chaîne de transport des électrons, marquant la liaison entre le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire. Il existe trois isoformes de l'isocitrate déshydrogénase : IDH1 (cytosolique), IDH2 et IDH3 (mitochondriales). L'IDH2 utilise le NADPH , tandis que l'IDH3 fonctionne avec le NADH (Ying, 2008). L' α -cétoglutarate déshydrogénase génère du succinyl-CoA tout en réduisant le NAD^+ en NADH . La succinyl-CoA synthétase hydrolyse le succinyl-CoA en succinate, produisant une molécule d'ATP. La succinate déshydrogénase (SDH) oxyde le succinate en fumarate, tout en générant du FADH_2 . La succinate déshydrogénase fournit le FADH_2 nécessaire à la chaîne respiratoire au niveau du complexe II, étant la seule enzyme du cycle de Krebs faisant partie intégrante de cette chaîne. La fumarate hydratase (FH) facilite la transformation du fumarate en malate, tandis que la malate déshydrogénase, dans la dernière étape du cycle de Krebs, convertit le malate en oxaloacétate, réduisant le NAD^+ (Stobbe et al., 2012).



L'alimentation en substrats en différents points du cycle permet de produire les intermédiaires nécessaires à la production d'ATP par les oxydations phosphorylantes (OXPHOS).

2.3. La chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) et les oxydations phosphorylantes

Les électrons transférés lors des réactions d'oxydation du cycle de Krebs sont acheminés à travers un système de transport d'électrons (CRM) jusqu'à un accepteur final : l'O₂. Ce transfert d'électrons s'accompagne de l'expulsion de protons vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient de protons et une différence de charges électriques de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne. En résulte un gradient électrochimique qui constitue une forme d'énergie permettant la synthèse d'ATP. La conjonction de la respiration cellulaire avec la production d'ATP est connue sous le nom d'oxydations phosphorylantes (OxPhos).

2.3.1. La théorie chimio-osmotique de Mitchell

Le mécanisme de couplage entre les réactions d'oxydoréduction et la phosphorylation, décrit sous le nom de théorie chimio-osmotique par Peter Mitchell en 1961 (Mitchell, 1961), a été récompensé par un prix Nobel en 1978. Ce couplage repose sur la translocation de protons, favorisée par les potentiels standards d'oxydo-réduction croissants. Le transfert d'électrons est possible grâce à cette translocation de protons, qui crée un potentiel électrochimique de protons ($\Delta\mu\text{H}^+$) de chaque côté de la membrane interne mitochondriale. Cette membrane a une faible perméabilité, ce qui permet la génération d'un gradient de protons appelé la force proton-motrice (Δp). Cette force est composée d'un gradient de charges ($\Delta\Psi_m$) et d'un gradient chimique ($\Delta p\text{H}$), où $\Delta p \text{ (mV)} = \Delta\Psi_m - 59 \Delta p\text{H}$.

L'ATP synthase utilise une partie de cette réserve d'énergie électrochimique pour produire de l'ATP, en utilisant 4 protons pour générer 1 ATP. Cependant, le gradient de protons n'est pas seulement crucial pour la production d'ATP ; il est également essentiel pour l'importation de protéines dans la membrane interne et la matrice mitochondriale (Geissler et al., 2000; Schleyer et al., 1982).

Chez les êtres humains, la majeure partie de l'énergie nécessaire aux cellules est générée grâce aux oxydations phosphorylantes. À titre d'illustration, une personne moyenne produit l'équivalent d'environ 65 kg d'ATP quotidiennement, qui représente le pool de molécules d'ATP entrant dans un cycle de phosphorylation/déphosphorylation (Rich et al., 2003).

2.3.2. La composition protéique des oxydations phosphorylantes

La NADH-coenzyme Q oxydoréductase ou complexe I (CI)

Le CI (EC 1.6.6.3) est composé de quarantetrois sous-unités dont six sont codées par l'ADNmt (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L et ND5) et possède une masse de 900kDa, faisant de lui le plus gros des complexes de la chaîne respiratoire (Remacle et al., 2008). La base du complexe est ancrée dans la membrane interne mitochondriale tandis que le site de fixation du NADH est orienté dans la matrice (Sharma et al., 2015). Le complexe I est un point d'entrée dans la chaîne respiratoire pour les électrons, permettant l'oxydation du NADH en NAD⁺. L'énergie libre dégagée par cette réaction permet la translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire mitochondrial. Parallèlement, le complexe I réalise la réduction du CoQ10. Cette réaction de réduction nécessite l'apport de 2 protons H⁺, impliquant donc deux réactions de pompage de protons. Il a récemment été montré que la première translocation de protons H⁺ permet la formation d'une semi-quinone et modifie la conformation du complexe, rendant celui-ci temporairement inactif (Zickermann et al., 2015). La seconde translocation permet la réduction totale de la semi-quinone en CoQH₂ et la réactivation du complexe I.

La succinate-coenzyme Q oxydoréductase ou complexe II (CII)

Le CII (EC 1.3.5.1) est composé de quatre sous-unités codées par l'ADNn uniquement et possède une masse de 124kDa. Deux des quatre sous-unités forment un complexe soluble dans l'eau (sous-unités 27 et 70 kD) et correspondent à la succinate deshydrogénase (SDH) tandis que les deux autres sous-unités sont associées à la membrane interne (Sun et al., 2005).

Le complexe II se situe à l'interface du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire. Il réalise l'oxydation du succinate en fumarate pour réduire le FAD en FADH₂ puis il prend en charge les électrons du FADH₂ et les transmet au pool quinonique situé dans la membrane interne mitochondriale. Cette enzyme est le deuxième point d'entrée des électrons. Des altérations dans l'activité du complexe II ont été liées au développement de troubles neurodégénératifs, tels que la maladie de Huntington (Butterworth et

al., 1985). Des mutations entraînant une dysfonction du complexe II peuvent également contribuer à la formation de cancers spécifiques (Hoekstra & Bayley, 2013).

La coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase ou complexe III (CIII)

Le CIII (EC 1.10.2.2) est un dimère, et chaque sous-unité est composé de onze chaînes polypeptidiques de 240kDa dont une est codée par l'ADNmt (Cytochrome b) (Xia et al., 1997). Le complexe III récupère les électrons transmis par le complexe I et II via le CoQ10. Ces électrons permettent la réduction du cytochrome c et dans un second temps, la réoxydation du CoQH2 via des groupements d'hèmes. L'énergie libre de cette réaction permet, comme pour le complexe I, la translocation de protons H⁺ de la matrice vers l'espace intermembranaire mitochondrial.

La cytochrome c oxydase (COX) ou complexe IV (CIV)

Le CIV (EC 1.9.3.1) ou cytochrome c oxydase (COX), est composé de treize sous-unités dont trois sont codées par l'ADNmt (COI, COII, COIII) d'une masse de 130kDa⁷⁴. Il assure l'oxydation du cytochrome c réduit, couplé à la réduction de l'O₂ moléculaire dans la matrice mitochondriale. L'énergie libre de cette réaction permet également la translocation de protons H⁺ de la matrice vers l'espace intermembranaire mitochondrial. Le complexe IV présente un intérêt particulier, car il pourrait servir comme un second mécanisme de régulation respiratoire, en plus de la force proton-motrice. Ce mécanisme repose sur une inhibition allostérique de la COX par l'ATP qui peut se lier du côté matriciel de l'enzyme, indépendamment du potentiel de membrane mitochondrial (Arnold & Kadenbach, 1997). Cette interaction permet d'ajuster la production d'énergie en fonction des besoins physiologiques.

L'ATP synthase ou complexe V (CV)

L'ATP synthase ou CV ou complexe F1-F0 (EC 3.6.1.34) est, comme les complexes de la chaîne respiratoire, localisée dans la membrane interne mitochondriale (von Ballmoos et al., 2009). Elle possède une masse proche de 450kDa et est constituée de seize sous-unités dont deux codées par l'ADNmt. L'ATP synthase comporte 2 sous-complexes : Le sous-complexe F1 qui contient le site catalytique (exposé du côté de la matrice mitochondriale) et le sous-complexe F0 qui sert au transfert vectoriel des protons (intramembranaire)

Cytochrome C (Cyt-C) et Ubiquinone ou Coenzyme Q (CoQ)

Ces molécules sont des transporteurs d'électrons mobiles.

Le Cyt-C est une hémoprotéine de 12 kDa, et joue un rôle essentiel dans le transfert d'électrons entre les complexes III et IV de la CRM (Kranz et al., 2009). La particularité du Cyt-C est qu'il est hydrosoluble, il se distingue donc des autres transporteurs d'électrons de la CRM qui sont incorporés dans la

membrane interne mitochondriale. Sa proximité avec cette dernière, semble être rendue possible par les cardiolipines qui sont un type de lipide très présent dans cette membrane (Hanske et al., 2012).

L'ubiquinone, également connue sous le nom CoQ ou quinone, facilite le transfert d'électrons des oxydoréductases à ubiquinones vers le CIII. Elle se compose d'un cycle benzoquinone hydrophile, qui joue le rôle de transporteur des électrons, et d'une chaîne carbonée isoprénique qui permet son incorporation dans la membrane mitochondriale interne. La chaîne carbonée est très variable en taille dans les différentes espèces vivantes (de 1 à 10). Chez l'homme c'est la forme à 10 carbones qui est présente d'où le fait que l'on retrouve souvent l'appellation CoQ₁₀. Le CoQ subit une réduction en ubiquinol par le biais de deux cycles de réduction monoélectronique, générant temporairement une semi-ubiquinone, qui est une forme radicalaire de l'ubiquinone (Hirst & Roessler, 2016). La réduction du taux de CoQ est liée au vieillissement (Langsjoen & Langsjoen, 2003), au stress, ou encore à certaines maladies comme l'insuffisance cardiaque (Molyneux et al., 2008).

2.3.3. Le transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire et la production d'ATP

Le processus des OxPhos démarre lorsque les électrons pénètrent dans la chaîne respiratoire via les complexes I ou II. Les électrons parviennent au complexe I lors de l'oxydation du NADH ou du FADH₂ via le complexe II, et ils sont transmis à l'ubiquinone. L'ubiquinone (ou Coenzyme Q ; CoQ₁₀) est une structure protéique mobile. C'est un intermédiaire qui a la capacité de cycliser entre une forme oxydée et une forme réduite, et donc de transférer des électrons d'un complexe enzymatique à l'autre (du CI et CII au CIII). Subséquemment, le complexe III transfère les électrons de l'ubiquinone réduite au cytochrome c. Comme le CoQ₁₀, le cytochrome c est une enzyme mobile présente dans la membrane mitochondriale interne et capable de transporter les électrons du CIII au CIV. Le complexe IV achève cette séquence en transférant les électrons du cytochrome c à l'O₂ qui est l'accepteur final des électrons. Ce transport des électrons s'accompagne d'une translocation de protons à travers la membrane mitochondriale interne en direction de l'espace intermembranaire par les complexes I, III et IV. Ce gradient de protons constitue une réserve d'énergie qui contribue au fonctionnement de l'ATP synthase ou complexe V pour produire de l'ATP (Figure 17).

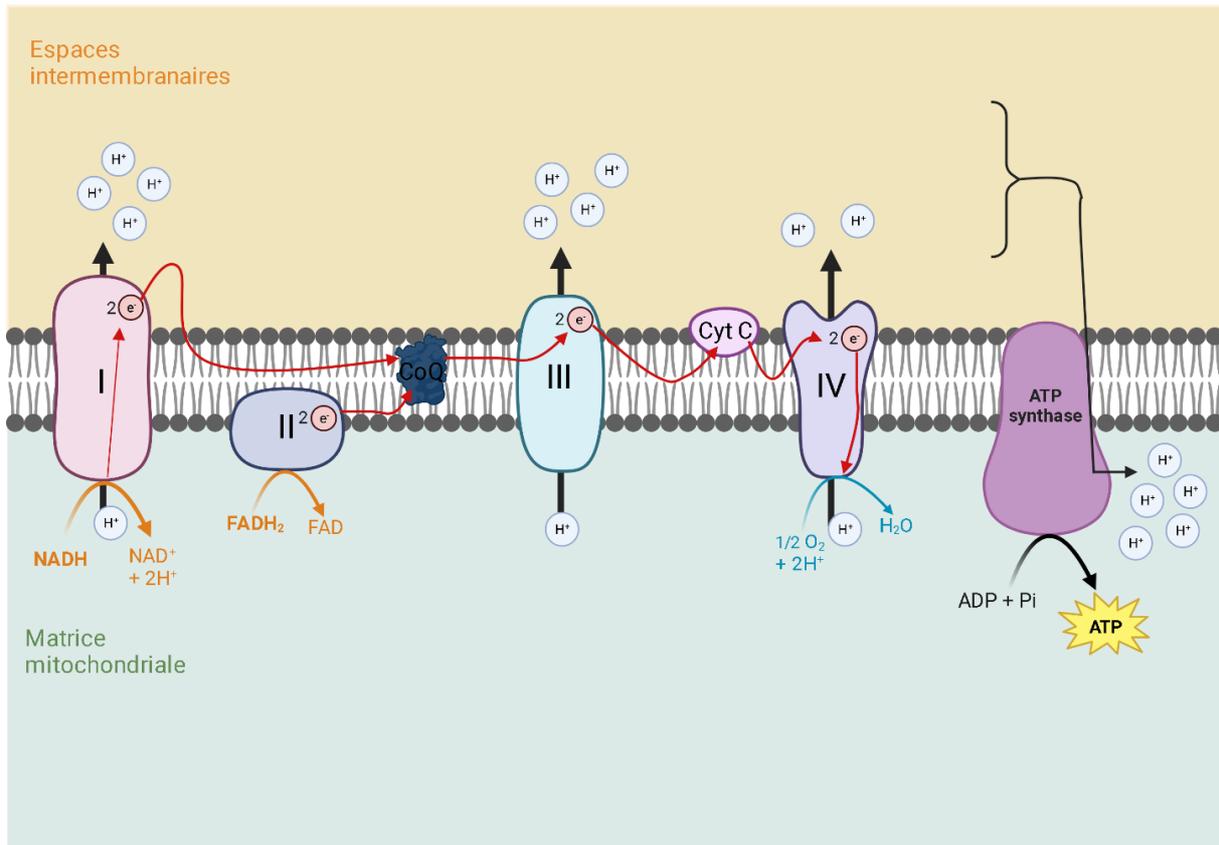


Figure 17. Schéma des OXPHOS. Le système de transport des électrons est composé des 5 complexes de la chaîne respiratoire, qui permettent le transfert d'électron jusqu'à l' O_2 . Les complexes I, III et IV transfèrent des protons dans l'espace intermembranaire. Ces protons passent alors à travers l'ATP synthase qui grâce à la force proton-motrice génère l'ATP. Coenzyme Q (CoQ), cytochrome c (cyt c).

2.4. Les principales voies alimentant la mitochondrie pour faire fonctionner le cycle de Krebs et les oxydations phosphorylantes

Différentes voies viennent alimenter la mitochondrie. Nous avons déjà évoqué la glycolyse, qui par la production de pyruvate est une voie importante d'alimentation de la mitochondrie. Le complexe enzymatique de la PDH est responsable de la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA. L'acétyl-CoA est aussi produit via la dégradation des acides gras (AG). La glutamine et les acides aminés sont transportés dans la mitochondrie ou ils serviront aussi de substrat à différentes voies mitochondriales (Pike Winer & Wu, 2014).

2.4.1. La β -oxydation

La β -oxydation des AG permet leur dégradation (Figure 18). Les AG libres à longues chaînes doivent tout d'abord être couplés avec l'acyl-CoA. Cette réaction, dépendante de l'ATP, est catalysée par les acyl-CoA synthétases. Une fois formés dans le cytoplasme, les acyl-CoA sont transportés dans la mitochondrie pour être dégradés en acétyl-CoA par la voie de la β -oxydation afin de produire de l'ATP. La β -oxydation des acides gras requiert alors trois étapes: le transport des acyl-CoA dans la mitochondrie, la dégradation des acyl-CoA en acétyl-CoA et l'oxydation des acétyl-CoA à travers le cycle de Krebs. Le processus d'oxydation des acides gras est extrêmement énergétique. Par exemple, lors de l'oxydation d'une molécule de palmitate (un AG contenant 16 atomes de carbone), on obtient la production de 7 molécules de $FADH_2$, 7 molécules de $NADH$ et 8 molécules d'acétyl-CoA. Lorsque ces équivalents réducteurs sont utilisés dans la phosphorylation oxydative, cela aboutit à la production de 131 molécules d'ATP. Il est cependant important de noter que l'activation initiale de la molécule de palmitate par l'acyl-CoA synthétase nécessite l'utilisation de deux molécules d'ATP. Par conséquent, la production nette d'ATP à partir d'une molécule de palmitate s'élève à 129 molécules d'ATP (Carracedo et al., 2013), ce qui en fait la voie métabolique qui génère la plus grande quantité d'ATP.

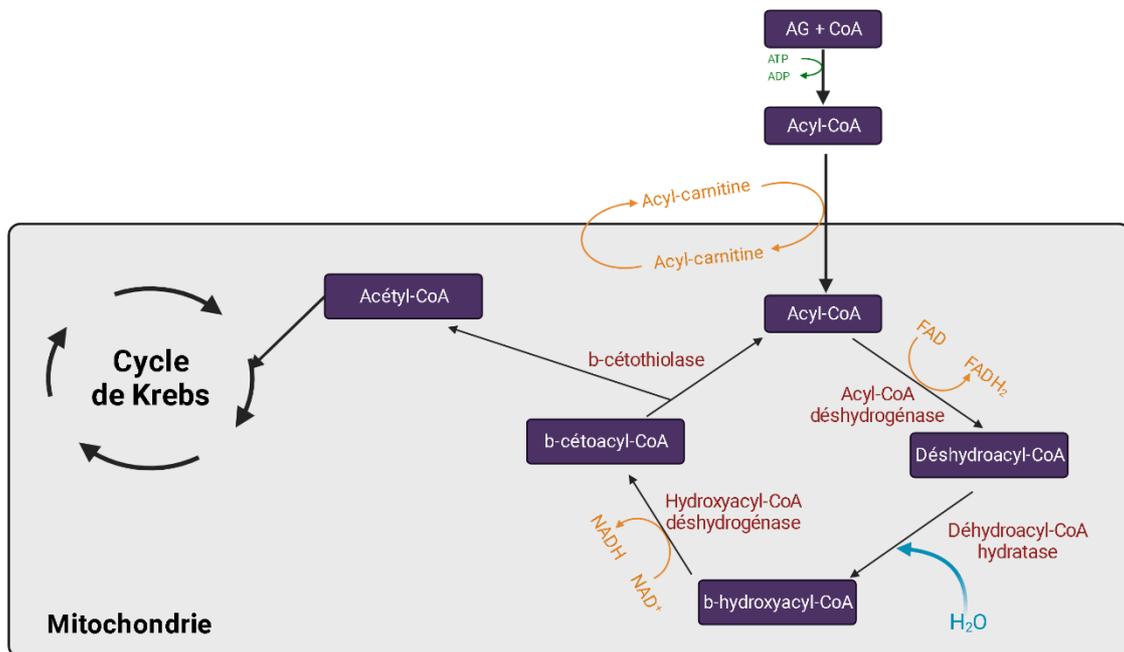


Figure 18. Schéma de la β -oxydation des AG. Ce système permet la dégradation des AG apportant les intermédiaires $NADH$ et $FADH_2$ nécessaires aux OxPhos pour produire de l'ATP.

2.4.2. La glutaminolyse

La glutamine est l'AA non essentiel le plus abondant dans le plasma. Son rôle est d'une importance capitale dans le métabolisme, puisqu'elle constitue la source prédominante d'azote réduit nécessaire à la synthèse des nucléotides et des acides aminés non essentiels (DeBerardinis et al., 2007). La glutamine peut être utilisée dans différentes voies pour former de l' α -KG, intermédiaire du cycle de Krebs (DeBerardinis et al., 2007; Fendt et al., 2013; Metallo et al., 2012; Mullen et al., 2012).

La glutamine pénètre dans le cytoplasme via le transporteur SLC1A5. Après avoir été dirigée vers la mitochondrie et traversée sa membrane, elle subit une métabolisation en glutamate, soit par l'action de la glutaminase 1, soit par celle de la glutaminase 2. Ce glutamate peut ensuite intégrer le cycle de Krebs via l' α -kétoglutarate (α -KG), générée par métabolisation via la glutamate déshydrogénase (GLUD). Ce processus peut ensuite, comme on l'a mentionné, conduire à la production de dioxyde de carbone (CO_2) et de nombreuses molécules d'ATP grâce aux OxPhos (Altman et al., 2016; Stumvoll et al., 1999).

Par ailleurs, le α -KG ainsi produit peut également contribuer à la synthèse de citrate, utilisé ultérieurement dans la formation des AG libres nécessaires à la production de triglycérides (Altman et al., 2016). Dans le rein et le foie, il peut également conduire à la formation d'oxaloacétate, puis de phosphoénolpyruvate, qui sera converti en glucose par la voie de la gluconéogenèse (Stumvoll et al., 1999). Les transaminases (ALAT et ASAT), tout comme la GLUD, ont la capacité de métaboliser le glutamate en α -cétoglutarate, tout en générant de l'alanine ou de l'aspartate. L'aspartate revêt une importance particulière car il participe à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques (Altman et al., 2016; Jacque et al., 2015). D'autres acides aminés tels que la sérine (Ser), la glutamine (Gln), ou encore la proline (Pro) dérivent directement de la transformation du glutamate dans le cytosol, grâce à des aminotransférases. Ceci facilite la synthèse de protéines, de glutathion ainsi que de fibres de collagène, des constituants de la matrice extracellulaire (Yoo et al., 2020). Inversement, le glutamate peut être généré à partir du cycle de Krebs par les mêmes enzymes mentionnées précédemment (Altman et al., 2016), ainsi que par les acides aminés notamment la leucine (Leu).

En résumé, le métabolisme de la glutamine/glutamate joue un rôle crucial dans le fonctionnement optimal du cycle de Krebs. Il peut emprunter diverses voies métaboliques indispensables à la survie des cellules, contribuant à la production de NADH, d'ATP, de glucose, d'acides gras, de protéines, etc. Il n'est donc pas surprenant que la plupart des tissus possèdent des enzymes telles que les glutaminases et la glutamine synthétase, capables de moduler, en fonction des stimuli, la production ou la dégradation de la glutamine et du glutamate nécessaires au cycle de Krebs.

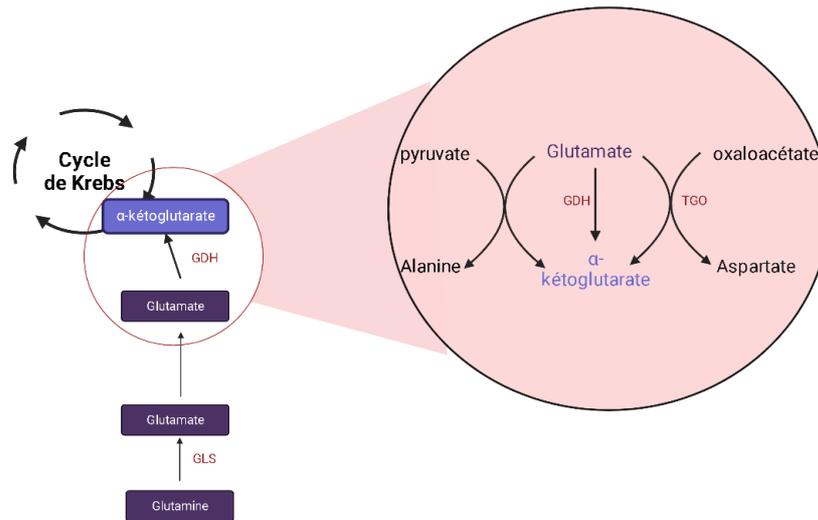


Figure 19. Schéma simplifié de la glutaminolyse.

2.4.3. La dégradation des acides aminés

Les acides aminés subissent une première étape de dégradation qui élimine le groupement α -aminé, réalisée soit par transamination, soit par oxydation. L'ion ammonium, ainsi libéré, est soit recyclé pour la formation d'un autre acide aminé, soit éliminé du corps. En parallèle, le squelette carboné résultant de cette opération peut être récupéré pour la synthèse de l'acide aminé correspondant, peut servir de matière première pour la synthèse des glucides (dans le cas des acides aminés glucoformateurs) ou bien, peut être converti en acétyl-CoA pour la production d'acides gras (pour les acides aminés céto-gènes). Les AA glucoformateurs (ou glucogéniques) incluent l'alanine (Ala), l'asparagine (Asn), l'aspartate (Asp), le glutamate (Glc), la Gln, la Pro, la Ser, la cystéine (Cys), l'arginine (Arg), l'histidine (His), la méthionine (Met), la thréonine (Thr) et la valine (Val). La dégradation du squelette carboné de ces derniers libère l'un des intermédiaires suivants : α -cétoglutarate, oxaloacétate, fumarate, succinyl-CoA et pyruvate. Les acides aminés céto-gènes (ou cétoniques) sont exclusivement la Leu et la lysine (Lys), et la dégradation de leur squelette carboné produit de l'acétyl-CoA ou de l'acétoacétyl-CoA.

Pour produire de l'ATP via la phosphorylation oxydative, tous les substrats nutritifs absorbés et utilisés par les voies de la glycolyse, de la β -oxydation, de la glutaminolyse et de la dégradation des acides aminés sont finalement oxydés via un ensemble de 9 réactions enzymatiques qui joue le rôle de plaque centrale dans le métabolisme mitochondrial.

Comme on l'a mentionné, la CoQ peut être alimentée en électrons par le complexe I et II, considérés comme les deux points d'entrées principaux de la CRM. Cependant, d'autres enzymes ont été décrites comme pouvant approvisionner la chaîne respiratoire en électrons.

2.5. Autres enzymes impliquées dans l'apport d'électrons à la chaîne respiratoire

La Glycérol-3-Phosphate déshydrogénase mitochondriale (G3PDH)

La G3PDH mitochondriale (EC 1.1.5.3) est une enzyme à FAD de 79kDa située sur la membrane interne mitochondriale (Klingenberg, 1970). La G3PDH oxyde le G3P en phosphate de dihydroxyacétone (DHAP) et, à son tour, le phosphate de dihydroxyacétone est réduit en glycérol 3-phosphate par la forme cytosolique de G3PDH (qui participe à la glycolyse). De cette manière, les équivalents réducteurs du cytosol (provenant de l'oxydation du NADH) sont transportés vers les mitochondries par l'intermédiaire de la CoQ où ils peuvent contribuer à la génération mitochondriale d'ATP (Klingenberg, 1970). Cette enzyme, est codée par le génome nucléaire, et est surtout exprimée dans le tissu adipeux brun, le cerveau, les muscles striés squelettiques, le foie et les testicules (Green, 1936; Koza et al., 1996; Ohkawa et al., 1969).

La Dihydroorotate déshydrogénase (DHODH)

La DHODH est la quatrième enzyme de la voie de biosynthèse des pyrimidines. Elle catalyse la conversion du dihydroorotate (DHO) en orotate (ORO), en transférant les électrons à l'ubiquinone. Cette enzyme à FMN est une protéine localisée au niveau de la membrane mitochondriale interne, dont le site actif fait face à l'espace intermembranaire (S. Liu et al., 2000; Walse et al., 2008).

L'électron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase (ETF-QO)

L'ETF-QO est la première enzyme impliquée dans la β -oxydation (Bartlett & Eaton, 2004; Watmough & Frerman, 2010). Elle permet le transfert des électrons provenant de l'oxydation d'acyl-CoA par l'ETF à l'ubiquinone (Crane et al., 1956; Hiltunen et al., 2010; Watmough & Frerman, 2010). L'ETF-QO est une enzyme extrinsèque de 64kDa de la membrane interne mitochondriale dont le site actif, dirigé vers la matrice mitochondriale, contient une FAD prosthétique (Figure 10). Cette enzyme possède un centre fer-soufre [4Fe4S] permettant le transfert des électrons du FAD à l'ubiquinone (Watmough & Frerman, 2010; J. Zhang et al., 2006). L'ETF-QO, qui est elle aussi exclusivement codée par le génome

nucléaire, est exprimée également de façon tissu spécifique et semble être plus présente dans les tissus comme le cœur ou les muscles striés squelettiques que dans le cerveau (Bartlett & Eaton, 2004).

Il existe un autre système qui est capable de transférer les électrons à la CRM via la CoQ. Cette voie va être décrite en suivant.

3. Le métabolisme du H₂S, substrat inorganique donneur d'électrons

3.1. L'oxydation du H₂S

Le sulfure d'hydrogène (H₂S) a joué un rôle crucial dans l'évolution de la vie sur Terre, il y a des millions d'années. Il a été utilisé pour synthétiser les éléments constitutifs du vivant tels que l'ARN, les lipides et les acides nucléiques et les premières formes de vie ont prospéré dans un environnement riche en H₂S pendant des centaines de millions d'années (Patel et al., 2015) (voir partie 2a). Dans les eaux profondes de la soupe primitive, le H₂S représente, en absence de lumières solaires, l'unique ou la principale source d'énergie pour les bactéries présentes (Gail, 1993). Ces organismes utilisaient le H₂S comme source d'électrons dans les réactions d'oxydoréduction. De nos jours, les bactéries peuvent produire du H₂S. Dans notre côlon, le H₂S est produit par des bactéries sulfato réductrices (BSR). Les BSR du côlon produisent du H₂S au cours de leur métabolisme, dans un processus appelé « dissimulatory sulfate reduction ». Dans ce processus, les composés contenant du soufre sont utilisés comme accepteurs finaux des électrons chez ces bactéries, remplaçant l'oxygène dans le système de respiration aérobie, pour produire de l'énergie. Ce phénomène est couplé à l'oxydation de l'hydrogène ou de substrats organiques qui servent de donneurs d'électrons pour ces bactéries (Barton et al., 2014). Le type de composés soufrés utilisés comme accepteur alternatif d'électrons par les BSR, diffère selon les espèces. De nombreuses espèces bactériennes utilisent du sulfite ou du thiosulfate. Cependant, la cystéine ou le glutathion peuvent être également utilisés par d'autres bactéries.

De nombreux organismes multicellulaires sont des anaérobies (M. Müller et al., 2012). En regardant de plus près des organismes comme *Arenicola marina*, un ver marin, il a été mis en évidence une nouvelle voie d'oxydation liée à la CRM par l'ubiquinone via l'enzyme sulfide quinone oxidoreductase (SQR) (Völkel & Grieshaber, 1997). Depuis, cette enzyme a été caractérisée chez l'homme (Jackson et al., 2019), de même que l'ensemble du système mitochondriale composée de trois réactions enzymatiques consécutives catalysées par la persulfide dioxygenase (ETHE1), la thiosulfate sulfurtransferase (TST) et la sulfite oxidase (SUOX).

3.2. Les enzymes impliquées dans la formation et l'utilisation du H₂S

3.2.1. Sulfide quinone oxidoreductase (SQR)

SQR est une protéine liée à la membrane mitochondriale avec deux centres rédox, un site actif trisulfure et un cofacteur flavine adénine dinucléotide (FAD), qu'il peut utiliser pour canaliser les électrons vers CoQ. Elle a tout d'abord été caractérisé chez *arenicola marina* (Theissen & Martin, 2008), avant que des gènes similaires soit décrits chez la souris et chez l'homme (Theissen et al., 2003).

3.2.2. Persulfide dioxygenase (ETHE1)

ETHE1 est une protéine homodimérique de la matrice mitochondriale contenant un groupement fer non hémunique. La perturbation génétique de la ETHE1 entraîne chez la souris une accumulation de H₂S ainsi qu'une réduction du niveau et de l'activité de la cytochrome c oxydase dans le muscle et le cerveau (Tiranti et al., 2004, 2009).

3.2.3. Thiosulfate sulfurtransferase (TST)

La structure de la TST consiste en deux domaines de taille similaire et de conformation quasi-identique, connectée par une boucle à la surface de la molécule (Libiad et al., 2015). La TST a été d'abord décrite pour avoir un rôle dans la détoxication du cyanure (Westley et al., 1983). Récemment, le rôle de cette enzyme dans la détoxication de l'H₂S dans les cellules coliques humaines a été démontré (Picton et al., 2002). Selon ces mêmes auteurs, cette enzyme catalyserait la formation de thiocyanate à partir de cyanure et de H₂S. Il est aujourd'hui largement accepté que le rôle de cette enzyme de détoxication du H₂S dans les cellules du côlon humain est indépendant de la présence de cyanure, qui est généralement considéré comme non physiologique par de nombreux auteurs (K. Wilson et al., 2008).

3.2.4. Sulfite oxidase (SUOX)

La SUOX est une protéine de 52 kDa présente dans l'espace mitochondrial intermembranaire. Elle utilise le molybdène comme cofacteur pour catalyser l'oxydation du sulfite en sulfate (Kisker et al., 1997). Un déficit d'expression de la sulfite oxydase entraîne des perturbations neurologiques sévères (Mudd et al., 1967).

3.3. Les différentes étapes d'oxydation par le H₂S

Le processus d'oxydation du H₂S commence par l'enzyme SQR. L'enzyme oxyde le H₂S et forme un intermédiaire persulfure lié à l'enzyme. Les deux électrons produits lors de cette réaction sont transférés par le FAD au CoQ puis au CIII de la CRM.

Au-delà de cette étape, il existe plusieurs possibilités quant à l'orientation de la voie. Le persulfure lié à l'enzyme SQR est soit accepté par le glutathion (GSH) soit par le sulfite (S₂O₃²⁻), formant du glutathion persulfide (GSSH). Le GSSH formé peut être davantage oxydé en S₂O₃²⁻ par le TST ou en SO₃²⁻ par la ETHE1. Des études récentes ont démontré que le GSH est le principal accepteur du persulfure lié à l'enzyme SQR (S. Singh & Banerjee, 2011). Cette conclusion est étayée par le fait que l'administration de cystéine à des patients présentant des mutations du gène ETHE1 améliore le taux d'H₂S.

Le SO₃²⁻ peut ensuite être rapidement oxydé en SO₄²⁻ par la sulfite oxydase (SO) présente dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Filipovic et al., 2018). La majorité du H₂S est finalement excrétée sous forme SO₄²⁻, ou il est ensuite éliminé dans l'urine.

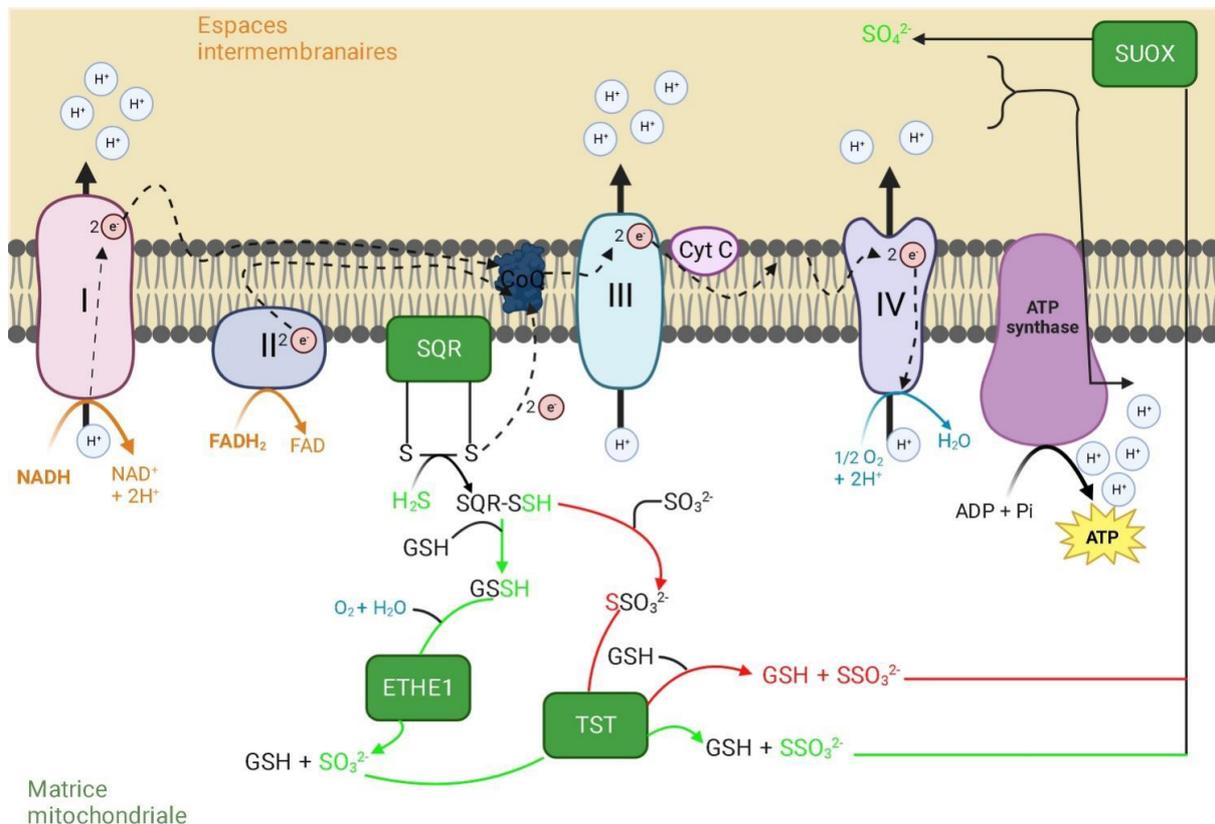


Figure 20. Schéma du métabolisme du H₂S. Le H₂S est initialement oxydé par la SQR, générant un persulfure lié au SQR (SQR-SSH) et libérant des électrons (e⁻) qui sont transférés à la CoQ et transportés le long de la CRM. Le SQR-SSH est transféré vers un accepteur de petites molécules tel que le GSH (ligne verte) ou le sulfite (SO₃²⁻) (ligne rouge). Si le GSH agit comme accepteur, une molécule de persulfure de glutathion (GSSH) est formée, qui est ensuite convertie, avec l'O₂ comme co-substrat, par la ETHE1 en SO₃²⁻ et GSH (ligne verte). Le SO₃²⁻ formé peut-être converti, avec GSSH comme cosubstrat, en thiosulfate (SSO₃²⁻) et GSH par la TST. SSO₃²⁻ est ensuite transformé en sulfate (SO₄²⁻) par la SUOX. En revanche, si SO₃²⁻ est

utilisé comme accepteur SQR-SSH, SSO_3^{2-} est formé (ligne rouge). Puisque GSSH est nécessaire au fonctionnement d'ETHE1, ce SSO_3^{2-} nécessite une transformation supplémentaire en SO_3^{2-} et GSSH par TST, en utilisant GSH comme co-substrat (ligne rouge). Le SO_3^{2-} résultant peut-être directement utilisé par SUOX pour produire du SO_4^{2-} (ligne rouge).

La voie mitochondriale d'oxydation du H_2S est reliée aux OxPhos par l'injection d'électrons dans le CoQ et à la formation des ROS (Gubern et al., 2007; Powell & Somero, 1986). La capacité d'oxyder le H_2S est présente dans la plupart des cellules, à l'exception du système nerveux central (Marcia et al., 2010). Chez les mammifères, le foie et le côlon sont les principaux sites d'oxydation des sulfures, et l'activité enzymatique se trouve dans les mitochondries (T. C. Bartholomew et al., 1980; Levitt et al., 2011). En 2010, Emilie Lagoutte a démontré que l'affinité des mitochondries pour le H_2S est très élevée, permettant son utilisation comme substrat énergétique à de faibles concentrations micromolaires (1 à 10 μM) (Lagoutte et al., 2010). Cependant, si l'apport de sulfure excède le taux d'oxydation, l'inhibition complète du Complexe IV se produit, rendant finalement les mitochondries inopérantes (Gubern et al., 2007). De plus, des données suggèrent que la fonction physiologique de cette voie pourrait aller au-delà de la simple détoxification du H_2S . L'impact de cette voie d'oxydation mitochondriale du H_2S sur la bioénergétique cellulaire dans des situations physiologiques ou pathologiques spécifiques doit être davantage analysé.

Des études qui ont exploré l'adaptation mitochondriale des cellules coliques humaines au H_2S ont montré qu'une incubation de cellule HT29 avec du H_2S (donneur de soufre NaHS) dans un milieu sans glucose, entraînait une inhibition totale de la respiration mitochondriale de ces cellules, accompagnée d'une augmentation significative de la concentration intracellulaire en succinate et d'une diminution de celle du malate dans les cellules exposées à NaHS (Gubern et al., 2007). Ces résultats ont conduit les auteurs à suggérer la possibilité d'un transfert des électrons générés par l'oxydation de H_2S vers le complexe II, ce qui entraînerait une réversion partielle du cycle de Krebs, se traduisant par la conversion du malate en succinate. Cependant, la signification physiologique de cette voie alternative reste à éclaircir. Une deuxième équipe a montré une augmentation des niveaux d'expression de la protéine de découplage UCP-2 et une diminution de l'expression des sous-unités I et II du CIV dans les cellules traitées au NaHS (Leschelle et al., 2005). Ce découplage mitochondrial résultant de ces changements pourrait réduire la production de ROS (Dawson et al., 1993). Ces résultats sont intéressants quand on sait que récemment il a été montré que l'oxydation du H_2S médiée par SQR initie la génération de ROS mitochondriales en pilotant le CI RET, qui, à son tour, induit un découplage mitochondrial dépendant des ROS via UCP (par exemple, UCP2 et ANT) et par conséquent active AMPK (Jia et al., 2020).

Même l'idée selon laquelle les eucaryotes utilisent de l'O₂ pour oxyder le H₂S de manière dépendante de la dose est discutée. Par exemple, lorsque des souris sont exposées à 80 ppm (2,3 mM) de H₂S, leur consommation d'O₂ chute de 50 %, réduisant également leur métabolisme de base, les plongeant dans un état similaire à l'hibernation (Blackstone et al., 2005).

Il est essentiel de clarifier davantage l'impact de la voie d'oxydation mitochondriale du H₂S sur les cellules dans des contextes physiologiques ou pathologiques spécifiques. De plus, il convient d'explorer les expériences menées sur cette voie au-delà de sa fonction traditionnelle de détoxification, en envisageant la possibilité d'utiliser cette voie comme source d'énergie, à l'instar des premiers organismes et des anaérobies contemporains.

4. Voie anaplérotique mitochondriale

Nous avons observé que le cycle de Krebs oxyde l'acétyl CoA provenant de diverses sources telles que les glucides, les corps cétoniques, les AG et les acides aminés, afin de générer du NADH et du FADH₂, indispensables à la synthèse d'ATP par la CRM. Le cycle de Krebs, en tant que voie amphibole, n'opère pas uniquement dans le catabolisme oxydatif des glucides, des AG et des acides aminés, mais fournit également des précurseurs pour de nombreuses voies de biosynthèse, notamment la gluconéogenèse (Owen et al., 2002). Idéalement, les intermédiaires du cycle de Krebs se régénèrent à chaque cycle, facilitant ainsi l'oxydation d'un nombre infini de molécules nutritives. Cependant, ces intermédiaires peuvent être détournés vers des voies cataplérotiques, fournissant des précurseurs pour la biosynthèse, et doivent être renouvelés par des voies anaplérotiques.

La cataplérose décrit les réactions impliquées dans l'élimination des intermédiaires du cycle de Krebs générées par l'entrée de composés dans le cycle lors de la dégradation des acides aminés et d'autres métabolites (comme le propionyl-CoA), ou par la carboxylation du pyruvate en oxalacétate. La nécessité biologique de la cataplérose réside dans la dynamique du cycle de Krebs.

L'anaplérose est le remplissage des intermédiaires catalytiques du cycle qui transportent l'acétyl-CoA lors de son oxydation. Les principaux substrats anaplérotiques sont le pyruvate, la glutamine/glutamate et les précurseurs du propionyl-CoA (acides gras à chaîne impaire, acides aminés spécifiques, corps cétoniques en C5). La cataplérose équilibre l'anaplérose en éliminant les intermédiaires en excès du cycle de l'acide citrique.

L'anaplérose et la cataplérose, ensemble, régulent les taux de biosynthèse en influençant l'approvisionnement en précurseurs, jouant des rôles sous-estimés dans le catabolisme et le statut

énergétique cellulaire. Selon la définition de Kornberg, l'anaplérose maintient exclusivement la fonction du cycle de Krebs et des autres voies amphiboliques (Kornberg, 1966). En d'autres termes, toute voie contribuant aux intermédiaires du cycle de Krebs, autre que la synthèse du citrate à partir de l'OAA et de l'acétyl-CoA, est généralement considérée comme anaplérotique. De même, toute voie qui élimine le carbone du cycle du TCA, sous une autre forme que le CO₂, est généralement considérée comme cataplérotique. Une définition aussi large inclut les cycles futiles, les navettes rédox et les voies cataboliques du métabolisme des acides aminés et du trafic d'azote.

La glutamine, l'acide aminé le plus abondant dans la circulation, est une source majeure de carbone pour l'anaplérose (DeBerardinis et al., 2007), notamment dans plusieurs cancers (Yuneva et al., 2007). Les cellules cancéreuses utilisent des précurseurs dérivés des intermédiaires du cycle du TCA pour synthétiser des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Afin de maintenir l'activité mitochondriale, ces cellules doivent compenser la perte de ces intermédiaires, causée par leurs détournements métaboliques. Normalement, la plupart des cellules importent des lipides. En revanche, dans des conditions riches en nutriments, de nombreux types de cellules cancéreuses synthétisent une quantité importante d'AG libres, de glycérides monoacyl-, diacyl- et triacyl, ainsi que de phospholipides pour répondre aux exigences de la nouvelle synthèse membranaire (Corbet & Feron, 2015).

Les sorties et entrées dans le cycle de Krebs sont cruciales. Un cycle fonctionnel nécessite un pool constant d'acétyl-CoA et un approvisionnement en intermédiaires de ce cycle du TCA qui peuvent être convertis en OAA. L'élimination des intermédiaires du cycle de Krebs (cataplérose) se produit à différentes étapes, fournissant des précurseurs aux processus de biosynthèse ou alimentant d'autres voies métaboliques. D'autre part, le remplacement des intermédiaires du cycle (anaplérose) est essentiel pour maintenir une production continue d'OAA. Les sources d'anaplérose sont présentées dans ce contexte, où plusieurs voies produisent de l'acétyl-CoA directement ou génèrent du pyruvate, une source indirecte d'acétyl-CoA grâce à l'activité du complexe PDH.

Les enzymes néoglucogéniques et les réactions de gluconéogenèse sont localisées dans le cytosol, mais le substrat de la pyruvate carboxylase (PCK1 et PCK2), l'OAA, est principalement produit dans les mitochondries par la PCK ou par l'enzyme malate déshydrogénase du cycle de Krebs. La conversion de l'OAA en PEP catalysée par PCK1 est étroitement liée au flux du cycle, qui est réciproquement modulé par les processus d'anaplérose et de cataplérose. Une autre enzyme la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C) joue un rôle essentiel non seulement dans la gluconéogenèse et la néoglycérologénèse, mais également dans la cataplérose, impliquant l'élimination des anions du cycle de Krebs (Hakimi et al., 2005). Cette enzyme catalyse la réaction chimique de transformation de

l'oxaloactétate en phosphoénolpyruvate (PEP). L'absence de ce processus chez les souris PEPCK-C/- entraîne une diminution significative du flux du cycle acide citrique dans le foie, avec pour conséquence une déviation des lipides hépatiques vers la synthèse de triglycérides, conduisant ainsi à une stéatose hépatique. La régulation de l'anaplérose et de la cataplérose dépend de l'état métabolique et physiologique, ainsi que du tissu/organe spécifique impliqué. Par exemple, en période de jeûne, la cataplérose, utilisant le PEP pour soutenir la gluconéogenèse, peut jouer un rôle régulateur dans le foie, tandis que dans le rein, l'anaplérose via l'absorption de glutamine peut être régulatrice.

CHAPITRE 3 : EVOLUTION, OXYGENATION ET METABOLISME CELLULAIRE

1. APPARITION DE L'OXYGENE SUR TERRE ET EVOLUTION DES ORGANISMES EUCARYOTES

1.1. Environnement terrestre au moment du développement des premiers organismes

Les premières traces d'organismes, essentiellement des procaryotes (organismes unicellulaires), ont été découvertes sur des roches qui datent d'environ 3,8 milliards d'années (Tashiro et al., 2017).

Peu après le refroidissement de la terre et son recouvrement par les océans, les gaz de l'atmosphère (acide cyanhydrique, formaldéhyde...) se sont dissouts dans l'eau. Au fond des mers, les hautes cheminées hydrothermales ont été des sources de chaleur et de composés réduits (sulfure d'hydrogène (H₂S), méthane (CH₄), ammonium (NH₄⁺)) et d'éléments métalliques (manganèse (Mn²⁺), fer (Fe²⁺), lithium (Li⁺), zinc (Zn²⁺) ...).

Selon l'hypothèse d'Alexandre Oparine et de John Haldane, une lente évolution chimique aurait précédé l'évolution biologique (Oparin, 1957; Haldane, 1929). De petites molécules organiques se sont formées dans l'atmosphère primitive dépourvue d'oxygène, puis se sont dissoutes dans les jeunes océans, donnant ainsi naissance à la soupe primitive, lieu d'apparition des premières cellules vivantes (Figure 22).

Une seconde hypothèse (panspermie), repose sur l'origine extraterrestre des monomères (acides aminés, oses, nucléotides). Des expériences en laboratoire qui tentent de reproduire les conditions de formation de la matière organique dans l'atmosphère primitive ont été lancées mais restent à ce jour

inabouties car de nombreuses molécules organiques comme des AA essentiels n'ont pu être synthétisées (Miller & Urey, 1959).

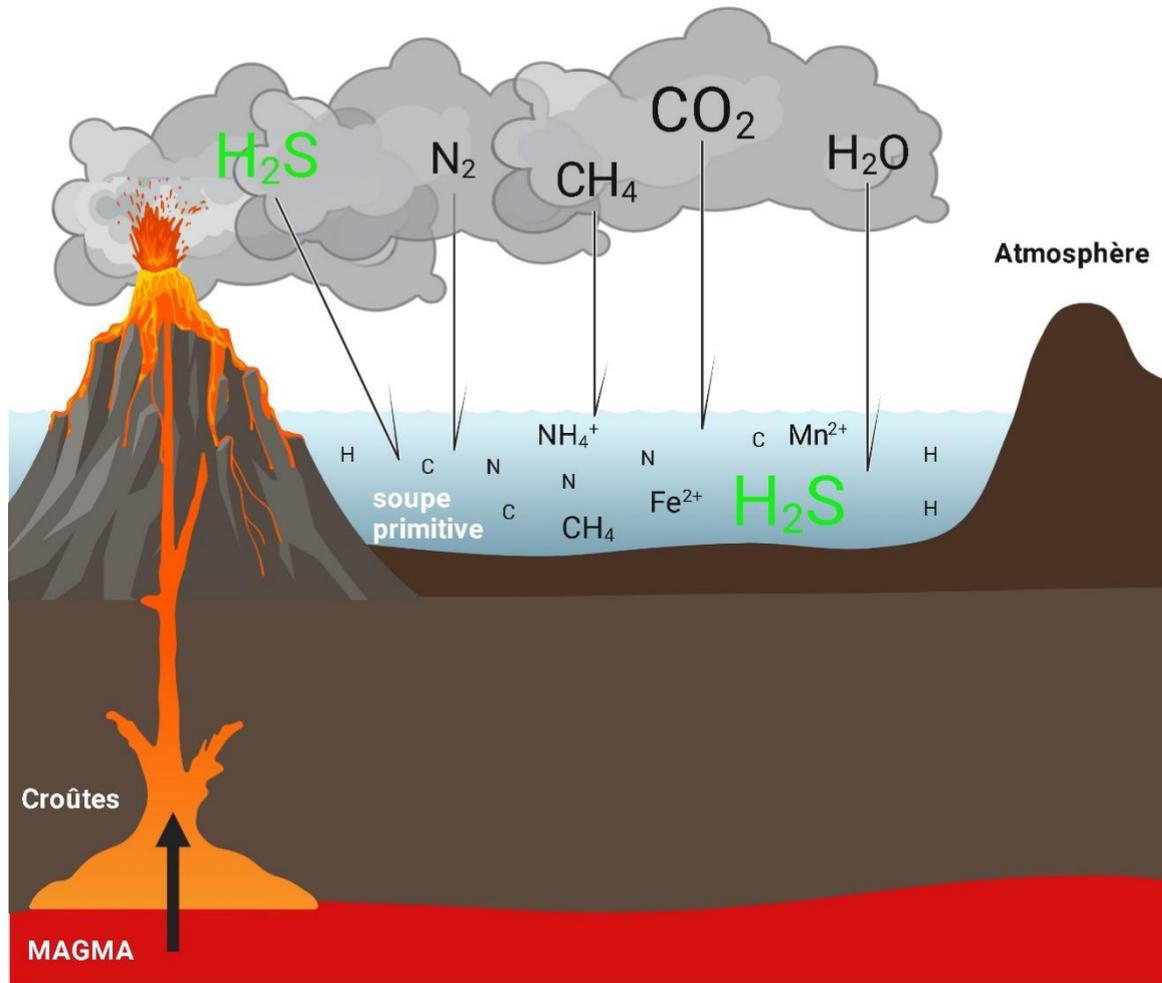


Figure 21. Condition environnementale primitive de la terre lors de l'émergence de la vie

Malgré ces origines encore discutées, la composition terrestre au moment du développement des premiers organismes unicellulaires est connue et l'étude du métabolisme de ces cellules identifiées.

1.2. Le métabolisme bioénergétique des premiers organismes apparus sur terre

Dans le milieu naturel primitif, la production énergétique des premiers organismes unicellulaires repose essentiellement sur la chimiosynthèse qui transforme l'énergie chimique des composés réduits présents dans la soupe primordiale en ATP :



Eric J. Gaidos et son équipe ont examiné les sources d'énergies disponibles dans cet océan à la composition putative et fourni une liste utile de donneurs et accepteurs anaérobies potentiels (Gaidos et al., 1999). Les anaérobies terrestres utilisent le sulfate (SO_4^{2-}), le nitrate (NO_3^-), le Fe^{2+} et le Mn^{2+} comme accepteurs d'électrons, le monoxyde de carbone (CO), le nitrite (NO_2^-) et le H_2S comme donneurs d'électrons. George D. Cody (Cody, 2004; Morowitz et al., 2000) a de plus démontré comment les minéraux sulfurés auraient pu être impliqués dans les voies métaboliques primitives.

Parmi ces procaryotes chimiosynthétiques, on distingue des bactéries méthanotrophes qui utilisent le méthane à la fois comme source d'énergie et de carbone, et des procaryotes chimiolithoautotrophes, dont les sulfo-oxydants utilisent l'énergie d'oxydation du H_2S et le CO_2 comme source de carbone.

Dans les premiers âges de la Terre, l' O_2 atmosphérique n'est produit que par l'action du rayonnement UV sur la vapeur d'eau et le CO_2 , et le niveau d' O_2 est très bas - entre 0,005 et 0,01% du niveau actuel (Pavlov & Kasting, 2002). Le soufre, rejeté par la chimiosynthèse ne change pas fondamentalement les conditions du milieu et de l'atmosphère. On comprend alors que la chimie du soufre présente un potentiel considérable pour élargir notre compréhension des premiers processus bioénergétiques.

Dans ces conditions anaérobiques, les procaryotes ont aussi développé une autre voie de transformation de l'énergie : la glycolyse anaérobie ou fermentation :



Cette voie de production énergétique perdure aujourd'hui chez des organismes vivant dans des niches marginales hypoxiques (M. Müller et al., 2012).

1.3. Le grand évènement d'oxygénation (GEO)

Il y a 3 milliards d'années, les organismes capables de photosynthèse apparaissent. Provoquant ainsi la première augmentation de l' O_2 dans l'atmosphère, connue sous le nom de Grand évènement d'oxydation (GEO) (Bekker et al., 2004; Holland, 2006; Kump, 2008), fondé sur la base d'éléments

géochimiques (Lyons et al., 2014). La découverte de l'ancêtre commun des cyanobactéries (Blank & Sánchez-Baracaldo, 2010), la génomique et les études évolutives ont alors fourni des informations sur l'évolution des protéines centrales impliquées dans la photosynthèse oxygénée (Sánchez-Baracaldo & Cardona, 2020). Ces organismes photosynthétiques utilisent l'énergie du soleil et la réduction du CO₂ pour former de la matière organique et de l'O₂ :



Un cycle de photosynthèse relâche approximativement 0,1% d'O₂ dans l'atmosphère (Stamati et al., 2011). On observe alors une augmentation de la concentration en O₂ atmosphérique représentant 10% de la concentration que nous connaissons actuellement (2,1%) (Goldblatt et al., 2006). Il aura fallu 100 millions d'années pour arriver à cette concentration. Ce laps de temps résultant de l'augmentation de la concentration en O₂ atmosphérique est relatif au fait que l'O₂ nouvellement produit est utilisé par d'autres réactions dans les océans. A cette époque la couche d'ozone n'était pas formée et, en présence de rayon UV, le méthane s'oxyde en CO₂. L'O₂ n'a donc pas fait son apparition de manière soudaine au cours des périodes géologiques, mais son abondance a augmenté progressivement, en corrélation avec l'évolution et l'adaptation des microorganismes et des eucaryotes.

1.4. L'apparition des premiers eucaryotes

Les eucaryotes sont des organismes dont les cellules possèdent un noyau et des organites membranaires, par opposition aux procaryotes (comme les bactéries) qui n'ont pas de noyau. Il existe de nombreuses hypothèses sur l'origine de la formation des eucaryotes.

1.4.1. La théorie endosymbiotique

La théorie aujourd'hui acceptée est la théorie endosymbiotique. Elle suggère que le noyau et les organites eucaryotes tels que les mitochondries et les chloroplastes étaient autrefois des bactéries autonomes qui ont été englobées par des cellules procaryotes. Cette théorie a été formulée pour la première fois par le biologiste russe Konstantin Mereschkowsky en 1905, date à laquelle il publie un article intitulé "Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche" (en français, "Sur la nature et l'origine des chromatophores dans le règne végétal") dans lequel il formule des idées préliminaires sur la symbiose entre des organismes ancestraux et des cellules eucaryotes

(Mereschkowsky, 1905). Il a notamment étudié les organites responsables de la photosynthèse chez les cellules végétales en avançant l'idée que ces organites étaient à l'origine des bactéries indépendantes. Cette idée est à l'origine de la théorie endosymbiotique, qui a été développée plus tard par d'autres scientifiques, notamment Lynn Margulis dans les années 1960 et 1970 (Sagan, 1967).

Cette symbiose aurait conféré aux cellules hôtes des avantages sélectifs (Kurland & Andersson, 2000), conduisant à la formation des premiers eucaryotes. La formation du noyau aurait été la résultante de cette symbiose créant le premier eucaryote commun appelé Archezoa (Cavalier-Smith, 1987).

La vision classique de l'évolution précoce des eucaryotes postule deux étapes principales :

- la présence d'un ancêtre eucaryote amitochondrial appelé Archezoa (issu de l'endosymbiose entre deux procaryotes qui a permis la formation d'un noyau)
- l'acquisition d'un ancêtre mitochondrial aérobie. L'origine de l'endosymbiote mitochondriale a été attribuée aux α -protéobactéries en raison de la forte similitude entre certains gènes et protéines dans la branche du génome mitochondrial et leurs homologues dans ce groupe (Esser et al., 2004; Gray et al., 2004). Les protéines de transport mitochondriales, comme Hsp60 et Hsp70, partagent également des similitudes avec les α -protéobactériens, bien que leurs gènes soient situés dans le génome nucléaire de l'hôte (Timmis et al., 2004).

1.4.2. Les premiers eucaryotes sont des organismes anaérobies

Dans le modèle classique, la diversification des lignées eucaryotes aérobies se fait ultérieurement et l'origine de la mitochondrie est liée à l'augmentation des niveaux d'O₂ atmosphérique. Plusieurs observations remettent en cause ce modèle.

Premièrement, il est désormais clair que les eucaryotes anaérobies contemporains ne se sont pas diversifiés avant l'origine des mitochondries. La découverte de protéines mitochondriales dans des espèces d'Archezoa (premiers eucaryotes) a mis en évidence qu'ils possédaient des organelles dérivées des mitochondries, tels que les hydrogénosomes et les mitosomes (Goldberg et al., 2008; Mi-ichi et al., 2009; Mürer, 1993; Tovar et al., 2003). Les hydrogénosomes, par exemple, sont des organites qui produisent de l'hydrogène, du dioxyde de carbone et de l'acétate en oxydant le pyruvate, effectuant des fonctions similaires à celles des mitochondries (Tielens et al., 2002). Ils génèrent de l'ATP par phosphorylation du substrat (Mürer, 1993), puis transfèrent cette énergie vers le cytosol à l'aide d'un transporteur ADP/ATP similaire à celui des mitochondries (Tjaden et al., 2004). Finalement, l'hypothèse la plus cohérente avec les données actuelles est que les mitochondries et les

hydrogénosomes partagent une ascendance commune qui explique les similitudes observées, tels que des mécanismes d'importation de protéines (Dyall et al., 2000), des processus communs pour l'assemblage des centres fer-soufre (Sutak et al., 2004), la régénération du NAD⁺ (Hrdy et al., 2004) et la présence de la succinate thiokinase, une enzyme mitochondriale du cycle de Krebs (Schnarrenberger & Martin, 2002).

Dans un second temps, de nouvelles études isotopiques suggèrent que des environnements anaérobies ont persisté après l'augmentation de l'O₂ atmosphérique et océanique. L'apparition de l'O₂ dans l'atmosphère il y a environ 2 milliards d'années est bien établie, il est maintenant proposé que jusqu'à il y environ 600 millions d'années, les océans étaient dans un état d'oxygénation intermédiaire. Les eaux de surface étaient oxygénées là où la photosynthèse avait lieu, tandis que les eaux souterraines étaient riches en sulfures et pauvres en oxygène (Poulton et al., 2004; Shen et al., 2003). En conséquence, le GEO dans l'atmosphère doit être distingué logiquement des environnements marins anoxiques. Dans ces derniers, les eucaryotes anaérobies ont pu prospérer en marge d'un monde oxygéné, une situation qui, dans certaines zones, persiste encore aujourd'hui (Fenchel & Finlay, 1995).

Les premiers eucaryotes sont donc des organismes qui possédaient déjà des mitochondries fonctionnant en mode anaérobie (utilisation de propionate, succinate, H₂S).

1.4.3. La cohabitation entre les organismes anaérobies et aérobies

Avant l'apparition de l'oxygène atmosphérique, en parallèle du développement des eucaryotes anaérobies, les organismes ont développé des mécanismes de production d'énergie aérobie. Les océans sont toujours riches en sulfide, mais il existe aussi dans l'environnement océanique des niches microoxic (C. Li et al., 2010). Ces niches écologiques permettent alors aux micro-organismes de développer des mécanismes de détoxification de l'O₂ et des premières respirations aérobiques. A cette époque, les premiers organismes "aérobies" sont de très petits animaux avec des taux métaboliques très bas (Sperling et al., 2013).

L'oxygénation des océans se fait progressivement et l'ensemble des niches écologiques coexistent : euxinique, anoxique/sulfurique, nanoaérobie et microaérobie. On observe durant ces périodes une cohabitation entre espèces aérobiques et anaérobiques. Les organismes eucaryotes anaérobies qui arrivent à se développer dans ces niches microoxiques peuvent utiliser leur mitochondrie en mode anaérobie et en mode aérobie. Ce type d'organisme existe encore de nos jours comme *Arenicola* ou *Urechis* et sont des reliques de ces premiers eucaryotes (M. Müller et al., 2012).

1.5. Le développement des eucaryotes complexes et la mise en place de l'oxygénation terrestre contemporaine

L'impact des événements géologiques, tels que la tectonique des plaques, l'apparition de la couche d'ozone et l'augmentation de l'oxygène dans l'atmosphère et les océans, ont permis aux organismes eucaryotes de se développer et de se complexifier. L'augmentation de la concentration en O₂ a eu des conséquences délétères, conduisant à l'extinction de nombreuses espèces (85%) incapables de résister à ce nouvel environnement oxydé. Mais certains organismes ont survécu grâce probablement au développement préalable de leurs mitochondries et de mécanismes de défense et de détoxification de l'oxygène dans ces océans et dans leurs différentes niches écologiques.

2. LES NICHES DES CELLULES SOUCHES SONT UNE REMINESCENCE DES MICROENVIRONNEMENTS DANS LESQUELS SE SONT DEVELOPPES LES PREMIERES CELLULES EUCARYOTES

3.1. L'oxygénation *in situ* physiologique chez l'humain

Il y a environ 2 milliards d'années, l'augmentation de la concentration d'oxygène dans l'atmosphère est devenue un facteur crucial influençant la vie. Cependant, cette élévation de l'oxygène présentait un défi pour les organismes vivants, car l'oxygène est toxique. Pour faire face à l'augmentation progressive de la concentration d'oxygène dans l'atmosphère, les organismes ont développé des mécanismes d'adaptation visant à détoxifier l'oxygène. En effet, l'augmentation de la concentration en O₂ sur terre est suivie de la première extinction de masse, où seuls les organismes ayant su s'adapter et développer ces mécanismes de détoxification ont pu survivre et persister jusqu'à aujourd'hui.

Les eucaryotes, dont la physiologie repose sur le métabolisme aérobie, ont évolué et sont devenus dépendants de ces mécanismes de détoxification de l'oxygène. Chez les mammifères, la concentration d'oxygène varie considérablement d'un tissu à l'autre. Par exemple, dans les poumons et la circulation sanguine, elle oscille entre 14 % et 4 % (Johnson et al., 2005; McKinley & Butler, 1999; Saltzman et al., 2003; Wild et al., 2005). Dans les organes bien vascularisés tels que le foie, les reins et le cœur, cette concentration se situe autour de ces mêmes valeurs (Jungermann & Kietzmann, 1997; Mik et al., 2004; Roy et al., 2003; Welch et al., 2001; Wölfle & Jungermann, 1985). Cependant, dans les tissus moins vascularisés, la concentration en O₂ est plus basse. Par exemple, dans le cerveau, elle varie de 0,5% à 7% (Hemphill et al., 2005; Nwaigwe et al., 2000; Whalen et al., 1970). Dans l'œil, la rétine et le corps vitré, elle se situe entre 1% et 5% (Buerk et al., 1993). Dans la moelle osseuse, cette concentration

varie de 0% à 4% (Chow et al., 2001a, 2001b). Cette régulation précise de la concentration d'oxygène dans différents tissus est essentielle pour assurer le bon fonctionnement des processus cellulaires et métaboliques (Ivanovic & Vlaski-Lafarge, 2016).

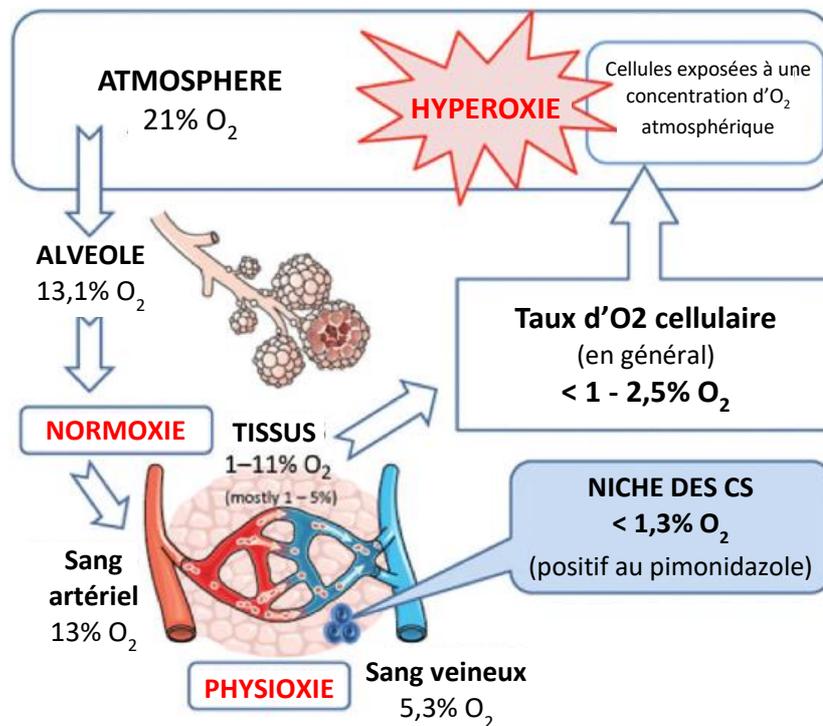


Figure 22. Schéma récapitulatif du gradient d'oxygène *in vivo* chez l'homme – adapté de Anaerobiosis and stemness - Ivanovic & Vlaski, 2016 (Ivanovic & Vlaski-Lafarge, 2016).

Si on fait un parallèle avec la partie I de ce chapitre, on peut noter qu'il existe une forte similitude entre le développement des eucaryotes dans les différents gradient d'O₂ au cours de l'évolution et la concentration *in situ* d'O₂. Comme mentionné ci-dessus, la vie animale a commencé à évoluer dans un environnement relativement pauvre en oxygène. Il est clair que les mécanismes fondamentaux de la vie cellulaire se sont établis de manière durable avant l'apparition de la diversité des formes de vie unicellulaires et multicellulaires que nous observons aujourd'hui. Les organismes multicellulaires modernes sont des structures complexes composées de nombreuses cellules qui interagissent dans leur environnement local ainsi qu'avec l'environnement externe. Il est plausible que la concentration d'O₂ au niveau cellulaire soit restée relativement constante au fil de l'évolution pour maintenir un environnement oxygéné similaire à ce qui existait il y a des millions d'années. La stratégie d'oxygénation réduite observée pourrait constituer un exemple remarquable d'homéostasie opérant sur une échelle de temps immense. Il existe deux raisons principales expliquant le maintien de la

concentration d'O₂ à l'intérieur des tissus dans une plage étroite, ni trop élevée, ni trop basse. Si on examine les extrêmes, la littérature scientifique a consacré une attention considérable aux problèmes liés au manque d'O₂ et son impact sur le tissu cérébral (Choi, 1990; Siesjö, 1978), ainsi qu'à l'excès d'O₂ et à sa toxicité, notamment la production de ROS. Il est largement admis que les ROS peuvent endommager les cellules, et cela est une hypothèse majeure en ce qui concerne le processus de vieillissement (Finkel & Holbrook, 2000; Kirkwood & Austad, 2000). Vivre dans un environnement oxygéné a nécessité l'évolution de stratégies cellulaires efficaces pour détecter et détoxifier les métabolites de l'O₂. Il est probable que le maintien d'une concentration en O₂ basse soit également un moyen simple et efficace de limiter la production de ROS.

Le professeur Massabuau a étudié les différentes concentrations d'O₂ dans le sang artériel chez diverses espèces aquatiques, en particulier les écrevisses (J. C. Massabuau & Burtin, 1984). Plusieurs expériences mettent en évidence la découverte d'une adaptation consistant à maintenir une faible et constante concentration d'O₂ chez ces espèces. Ceci s'inscrit dans le cadre du répertoire physiologique normal des respirateurs aquatiques, c'est-à-dire des animaux qui respirent de l'air dissous dans l'eau pour effectuer leurs échanges gazeux (O₂ et CO₂). Les données montrent que la concentration en O₂ artérielle dans un panel de crustacés, malgré leurs différences physiologiques, présente des valeurs majoritairement faibles, avec des concentrations autour de 1-3 %. Ces résultats sont similaires chez les mollusques d'eau douce (*Anodonta cygnea*; J.-C. Massabuau et al., 1991), comme la palourde asiatique (*Corbicula fluminea*; Tran et al., 2000), ainsi que chez le silure (*Silurus Glanis*; Forgue et al., 1989).

La faible concentration d'O₂ sanguine chez les poissons, crustacés et les mollusques est peut-être l'un des mécanismes nécessaires pour comprendre le phénomène du faible vieillissement chez ces êtres vivants.

On peut de ce fait faire le lien entre la concentration hypoxique de la MO et le maintien des CSH et CSM tout au long de la vie d'un individu.

3.1. L'oxygénation de la niche des cellules souches hématopoïétiques et stromales mésenchymateuses

Les CSH et les CStroM résident dans les niches hématopoïétiques présentent dans la MO (voir chapitre 1). La première hypothèse de la présence de très basses concentrations d'O₂ dans la niche médullaire remontent aux années 1990 où il a été rapporté qu'une basse concentration d'O₂ est favorable au maintien et la préservation des cellules souches (Cipolleschi et al., 1993; Dello Sbarba et al., 1987). La première analyse des concentrations gazeuses de la MO a montré que la concentration moyenne d'O₂

est d'environ 5 à 7 % (40 à 54 mmHg) (Harrison et al., 2002; Pennathur-Das & Levitt, 1987). Par mesure directe *in situ* à l'aide d'électrodes à O₂, Daniel J. Ceradini a montré par la suite que la concentration moyenne d'O₂ dans la MO de souris est d'environ 2,4 % (Ceradini et al., 2004). Cependant, ces valeurs représentent la valeur moyenne pour une masse de tissu relativement importante et ne tiennent pas compte du fait que la concentration d'O₂ dans les tissus solides est hétérogène et qu'elle diminue significativement avec l'éloignement des vaisseaux sanguins et avec une augmentation du nombre de couches cellulaires qui entravent la diffusion de l'oxygène dans les tissus (Hevehan et al., 2000; Krogh, 1919). Cela s'applique particulièrement à la MO puisque son organisation histologique est constituée d'agglomérats de cellules hématopoïétiques de différentes lignées sanguines situées dans les espaces extravasculaires du réseau de vaisseaux sanguins, et de cellules stromales à l'intérieur des os trabéculaires. Partant de ces prémisses, Dominic C. Chow et son équipe ont créé un modèle mathématique de distribution de l'O₂ dans la MO à partir duquel ils ont supposé que les CS sont situées dans des régions presque anoxiques (Chow et al., 2001a, 2001b). B.I. Lord a été le premier à déterminer la localisation physique relative des progéniteurs dans la MO, montrant que la concentration de progéniteurs primitifs (CFU-S) augmente du centre vers les zones plus proches de la surface osseuse, tandis que la concentration de CFC plus matures augmente dans la direction opposée (Lord et al., 1975). Récemment, Kalindi Parmar a déterminé la distribution des CSH dans la MO le long du gradient de concentration d'O₂. Pour cela, son équipe a utilisé le fluorochrome diffusible Hoechst 33342 (Ho), qui sert de marqueur vasculaire *in vivo*, car lorsqu'il est administré par voie intraveineuse, il se lie à l'ADN des cellules proches des vaisseaux sanguins, son gradient de perfusion correspond donc au degré de vascularisation et donc au degré d'oxygénation des tissus. L'analyse de la distribution cellulaire a montré que les CS (comme le démontre le test Cobblestone Area-Forming Cells) et leur capacité à reconstituer l'hématopoïèse à long terme chez des souris immunodéficientes) dans la MO sont situées à l'extrémité du gradient de perfusion Ho provenant des vaisseaux sanguins, tandis que les progéniteurs et précurseurs hématopoïétiques se trouvent dans des régions mieux oxygénées (Parmar et al., 2007).

3.1. L'oxygénation est un facteur de régulation des cellules souches hématopoïétiques et des cellules stromales mésenchymateuses

Lorsque les CS sont cultivées *in vitro* à un niveau d'O₂ qui n'est pas le même que celui offert par le microenvironnement de la niche, les cellules subissent un ensemble d'altérations, telles que le stress oxydatif, un changement du métabolisme, une prolifération et un auto-renouvellement réduits, ainsi qu'une altération du potentiel de différenciation.

La concentration très basse en O₂ (<1%) qui existe dans la niche permet la préservation du stock de CSH dans la phase G0 du cycle cellulaire (Hermitte et al., 2006). Une augmentation de la concentration autour de 1% d'O₂ permet l'autorenouveaulement des CSH et limite la prolifération des progéniteurs (Cipolleschi et al., 1993; Ivanović, Bartolozzi, et al., 2000; Ivanovic et al., 2002; Ivanović, Dello Sbarba, et al., 2000). Les concentrations intermédiaires 1-3% permettent l'expansion des progéniteurs avec le maintien du pool des CSH (Danet et al., 2003; Ivanovic et al., 2004). L'augmentation de la concentration à 5% d'O₂ favorise la prolifération et la différenciation des progéniteurs (M. Koller et al., 1992; M. R. Koller et al., 1992, 1992; Lu & Broxmeyer, 1985; Muench et al., 1992; Pennathur-Das & Levitt, 1987). La concentration présente dans l'air (21% O₂) est beaucoup plus élevée que de la valeur physiologique, et provoque la prolifération et la différenciation des CSH vers des progéniteurs et précurseurs et entraînent l'épuisement du pool des CSH (Ivanovic, 2009; Ivanovic et al., 2004). Des cellules progénitrices de sang placentaire cultivées à 20% d'O₂ ont montré une augmentation d'anion superoxyde (O₂⁻) et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par rapport à celles cultivées à 5% d'O₂ (Fan et al., 2008). Selon l'équipe de Sigma Mostafa, une faible concentration en O₂ favorise l'autorenouveaulement des CSH *in vitro* alors qu'une forte concentration induit leur différenciation (Mostafa et al., 2000). Une augmentation de la prolifération et de la formation de colonies de cellules primitives a été observé chez les CStrom humaines et murines exposées à des concentrations d'oxygène variant de 1 à 5%, par rapport à celles cultivées dans des conditions hyperoxiques (21% O₂) (Boyette et al., 2014; Fehrer et al., 2007). Il a été avancé que cette augmentation de l'auto-renouveaulement pourrait être liée à une régulation négative de p16, permettant d'éviter la sénescence (Jin et al., 2010). Cette protéine inhibitrice de kinase, active de nombreux gènes qui favorise le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. En parallèle à la régulation négative de p16, l'hypoxie conduit à la stabilisation du facteur inductible par l'hypoxie (HIF), ce qui peut entraîner l'activation de multiples voies de signalisation à l'intérieur de la cellule, notamment une augmentation des niveaux d'expression de la protéine anti-apoptotique Survivine. (Kiani et al., 2013). Les CSM humaines et murines cultivées dans des conditions à basse concentration en O₂ (à des concentrations d'O₂ de 2 à 5%) présentent également une régulation positive de leur multipotence, se traduisant par une régulation positive de gènes souches, tels qu'Oct-4, Sox2, Nanog, ainsi que de gènes mésodermiques précoces (Fehrer et al., 2007; Jin et al., 2010; Valorani et al., 2010). Les CStrom de MO humaine cultivées dans ces concentrations physioxiques présentent une différenciation diminuée en adipocytes et ostéocytes (Holzwarth et al., 2010). D'autres recherches ont également montré que les CStrom dérivées de la MO ont une capacité de différenciation réduite en conditions de culture hypoxique par rapport à des conditions à 20% d'O₂. Les CStrom pourraient donc maintenir leurs caractéristiques de "véritables CS" dans des concentrations physioxiques de basse concentration en O₂, en conservant un état indifférencié, ainsi qu'en régulant positivement des gènes associés aux lignées mésodermiques et

non mésodermiques. De plus, le préconditionnement des CStroM dans ces conditions pendant une période de 24 à 72 heures a démontré des propriétés immunomodulatrices significativement renforcées du sécrétome récolté par rapport aux conditions de culture hyperoxiques (Lotfinia et al., 2017). Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle un faible taux d'O₂ favorise un état de non-différenciation des CS (D'Ippolito et al., 2006; Fehrer et al., 2007).

Il est fondamental de noter que les besoins en O₂ ne concernent pas seulement le métabolisme cellulaire, même si 90 % de l'offre en O₂ est consacrée à répondre à la demande mitochondriale. Plus précisément, il existe plus de 100 réactions enzymatiques qui utilisent l'O₂ comme substrat et la plupart d'entre elles peuvent être fortement affectées par les changements de concentration en O₂ *in situ* (Vanderkooi et al., 1991).

3. LE PROFIL BIOENERGETIQUE DES CELLULES SOUCHES ADULTES

3.1. Les voies métaboliques utilisées par les cellules souches adultes

Contrairement aux CSE, les CS sont quiescentes, en phase G₀ du cycle cellulaire, et rentrent en division lente pour s'auto-renouveler. De nombreux types de cellules souches adultes tels que les CSH et les CSM résident dans des niches peu oxygénées (voir chapitre 1 et partie 2 de ce chapitre) (Ito & Suda, 2014). De nombreuses preuves expérimentales montrent que l'environnement hypoxique dans lequel se trouvent les CS participe à leur maintien et leur quiescence, et la sortie vers un environnement comportant plus d'O₂ orienterait les cellules vers leur expansion clonale et leur différenciation (Mohyeldin et al., 2010; Suda et al., 2011). Encore une fois le profil glycolytique des CSA est la résultante d'une « pré-installation » métabolique.

Comme mentionné dans le chapitre 1, la niche hématopoïétique possède une composition riche en cellules de soutien permettant la régulation du métabolisme des CSH. Outre un environnement appauvri en O₂, il existe un gradient croissant d'O₂ de 0 à 4 % allant de l'endoste à la région perisinuséale où se trouvent les CSH (Parmar et al., 2007). Des études menées sur des souris montrent que les LT-CSH sont d'avantages glycolytiques dans la niche à faible concentration en O₂ : elles consomment moins d'O₂ et ont un potentiel mitochondrial plus faible (Simsek et al., 2010). D'autres études montrent que la délétion combinée des gènes codant la PDK2 et PDK4 montre un défaut de reconstitution de la part des CSH dans des souris immunodéprimées (Aad et al., 2013). D'un point de vue métabolique, rappelons que la PDK inactive la PDH inactivant elle-même l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie et redirigeant ainsi le métabolisme vers la fermentation lactique. Les mêmes auteurs ont montré un enrichissement de F1,6-BP dans les CSH les plus primitives comparées aux

cellules progénitrices plus engagées. Ce métabolite permet une action allostérique sur la PK maximise donc le flux glycolytique de cette étape de création d'ATP. Dans l'étude de ce métabolome, les métabolites du cycle de Krebs n'ont pas été détectés, montrant une activité mitochondriale du cycle diminuée (Aad et al., 2013). Une étude protéomique a montré que dans des cellules CSH primitives LSK, l'isoforme HK1 était plus exprimé alors que HK2 et HK3 le sont d'avantages dans les progéniteurs myéloblastiques (Klimmeck et al., 2012). L'HK1 est associé au catabolisme glycolytiques dans des cycles cellulaires ralentis (J. E. Wilson, 2003) alors que les deux autres isoformes ont plutôt un rôle anabolique dans les progéniteurs proliférant rapidement (Shyh-Chang et al., 2011).

Même si les CSA sont principalement glycolytiques, elles possèdent des mitochondries actives qui leur permettent de passer rapidement vers les oxydations phosphorylantes afin de répondre à la forte demande en énergie liée à la différenciation. Sous l'influence de stimuli extérieurs les CS s'activent et sortent de leur état de quiescence. Leur métabolisme augmenté peut répondre aux besoins accrus en énergie et en biomatériaux. Elles sortent alors peu à peu de la niche et augmentent donc leur apport en oxygène. La bioénergétique des CS est étroitement régulée par des signaux extracellulaires et des facteurs internes. En plus du microenvironnement quasi-anoxique, des protéines, telles que des kinases et des facteurs de transcription, interviennent pour moduler les voies métaboliques en fonction de l'état de la cellule. Les CS possèdent une certaine flexibilité métabolique qui permet un rapide passage aux OxPhos pour répondre à la forte demande en énergie liée à l'expansion clonale et la différenciation des CS. Cette flexibilité métabolique permet d'assurer quantitativement et qualitativement deux demandes opposées : la quiescence et l'auto-renouvellement (dans la niche à faible oxygénation) et la différenciation vers des progéniteurs nécessitant plus d'énergie (dans la niche présentant des concentrations d'O₂ plus élevées). Si on inhibe certaines fonctions mitochondriales comme la protéine mitochondriale tyrosine phosphatase 1 (PTPMT1), une phosphatase nécessaire à la fonction mitochondriale, on bloque la différenciation et cela entraîne une anémie sévère (W.-M. Yu et al., 2013).

Il en est de même pour les CSM localisées également dans les niches à faible concentration en O₂. Elles sont glycolytiques dans la niche et se mettent à utiliser un métabolisme mitochondrial en sortant peu à peu de la niche lors de leur différenciation. Cependant, même lors d'une expansion dans des conditions hyperoxiques (21% d'O₂), les CStroM possèdent une expression plus élevée d'enzymes glycolytiques et une expression diminuée d'enzymes de la CRM comparés à des ostéoblastes (G. Chen et al., 2011). Donc cette propriété métabolique est intrinsèque aux cellules. Le conditionnement en hypoxie (<5% d'O₂) des CStroM peut améliorer leur capacité fonctionnelle souche comme l'auto-renouvellement et la capacité à former des colonies de cellules fibroblastiques et leur capacité de multipotence (voir chapitre 1) (Estrada et al., 2012). Il est aussi intéressant de noter que la

différenciation des CStrom en ostéoblastes et adipocytes est associée à une biogenèse mitochondriale et une augmentation des OxPhos alors que la différenciation chondrocytaire requiert une concentration faible en O₂ et une activité mitochondriale diminuée (Pattappa et al., 2011).

3.2. Le facteur HIF : régulateur du métabolisme des cellules souches dans la niche à basse concentration en O₂

Les facteurs HIF ont un rôle central et primordial dans la réponse cellulaire à l'oxygénation en induisant la transcription de plusieurs centaines de gènes qui interviennent dans divers aspects de la physiologie cellulaire, notamment la survie, l'adhésion, la prolifération, l'apoptose, l'angiogenèse et la glycolyse (Semenza & Wang, 1992).

À l'origine, il a été identifié comme le principal régulateur de l'érythropoïétine (EPO), une hormone glycoprotéique essentielle à la production de globules rouges, en réponse à une baisse de la concentration d'O₂ dans les tissus rénaux (Semenza & Wang, 1992).

3.2.1. La structure de HIF

Les facteurs HIF sont des hétérodimères de types basic Helix-Loop-Helix (bHLH), constitués d'une sous-unité HIF- α , sensible au variation d'O₂ et d'une sous-unité HIF- β constitutive et stable (aussi appelé « aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator » ; ARNT). Il existe trois isoformes de la sous-unité α (1 α , 2 α , et 3 α) et deux isoformes de la sous-unité β (1 β et 2 β) (Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2007).

Même si les isoformes de HIF partagent des similitudes dans leur structure, leur régulation et leurs fonctions, chacune des sous-unités présente des caractéristiques spécifiques. HIF-1 α est ubiquitaire, tandis que HIF-2 α , HIF-3 α , montrent une expression plus restreinte (Y. M. Lee et al., 2001). Parmi les sous-unités alpha, le rôle de HIF3 α demeure relativement obscur, bien qu'il ait été établi que le phénomène de "splicing" alternatif de HIF-3 α a pour effet d'inhiber l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α et HIF-2 α . Ce mécanisme fonctionne, en grande partie, en entrant en compétition avec les coactivateurs p300/CBP de HIF-1 α et HIF-2 α (Makino et al., 2001; Maynard et al., 2007). De ce fait, HIF-3 α agit en tant que régulateur négatif de la réponse hypoxique, tandis que les autres sous-unités alpha sont responsables de la transmission du signal hypoxique. On se concentrera sur les deux facteurs de transcription HIF1 et HIF2.

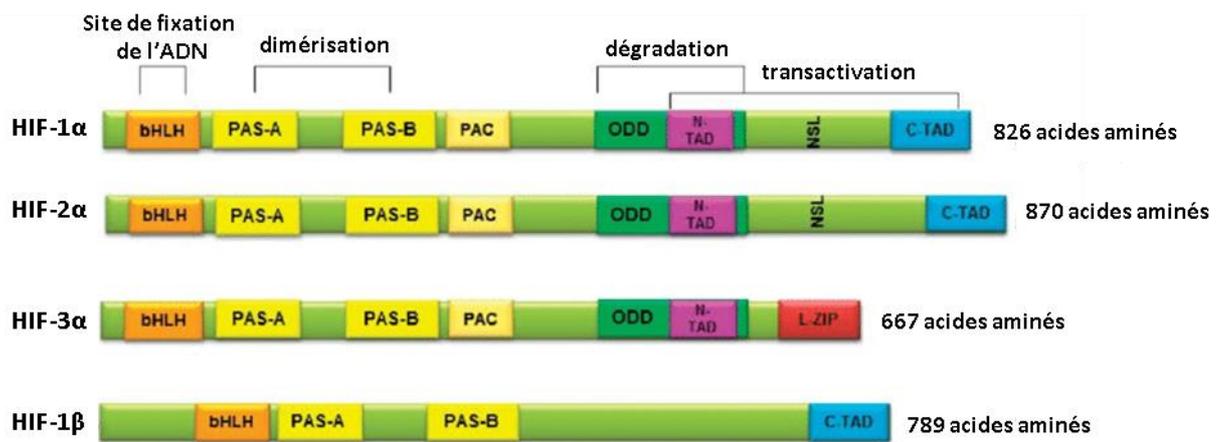


Figure 23. Schéma de la structure du domaine des différentes sous unités HIF (HIF-1 α ; HIF2 α , HIF-3 α et HIF-1 β) humaines. Le domaine ODD assure la stabilité régulée par l'O₂ grâce à l'hydroxylation de deux résidus Pro et à l'acétylation d'une Lys. Les résidus pro sont conservés dans HIF-2 et HIF3. Le nombre total d'acides aminés de chaque sous-unité est marqué à la fin de la structure du domaine. Schéma modifié à partir de l'article « The Role of Hypoxia-Inducible Factors in Cancer Resistance » (Saint Martin et al., 2017).

En plus de partager des domaines de liaison à l'ADN (bHLH) et de dimérisation (PAS), ces deux sous-unités alpha présentent également une similitude dans un domaine sensible à la concentration d'O₂, appelé ODD. De plus, elles possèdent deux domaines de transactivation : le domaine d'activation N-terminal (N-TAD) et le domaine d'activation C-terminal (C-TAD). Ces domaines de transactivation sont situés dans la partie C-terminale du domaine TAD.

Cette similitude de séquence confère des caractéristiques communes à HIF-1 α et HIF-2 α (Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Hu et al., 2003). Par exemple, les deux sous-unités α sont capables de former un dimère avec la sous-unité β , et elles subissent une déstabilisation similaire en présence d'O₂. De plus, leur activité transcriptionnelle dans la région C-TAD est régulée par le facteur « factor inhibiting HIF » (FIH). FIH effectue l'hydroxylation d'un résidu d'asparagine spécifique (N803 pour HIF-1 α et N847 pour HIF-2 α), bloquant ainsi le recrutement des co-activateurs p300 et CBP (Lando et al., 2002; Mahon et al., 2001).

3.2.2. La régulation des facteurs HIF

Les équipes de Peter J. Ratcliffe et de William G. Kaelin Jr ont publié des données sur le mécanisme d'activation de HIF-1 impliquant une activité hydroxylase dépendante du fer et de l'oxygène (Kaelin & Ratcliffe, 2008). En effet, l'élément central du mécanisme de dégradation des protéines HIF réside dans la région ODD, où les prolines 402/564 pour HIF-1 α et les prolines 405/531 pour HIF-2 α subissent une

hydroxylation en présence d'O₂. L'activité hydrolase est assurée par l'enzyme prolylhydroxylase (PHD) qui est le senseur de l'oxygène cellulaire (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Ces enzymes sont des dioxygénases sensibles à la concentration d'O₂, au fer (Fe²⁺), et au 2-oxoglutarate (Epstein et al., 2001). Il existe trois isoformes de PHD (PHD1, PHD2 et PHD3), qui ont des affinités différentes pour les sous-unités HIFα, avec PHD2 préférant HIF1α et PHD1 et PHD3 intervenant plutôt dans l'hydroxylation du dimère HIFβα (Appelhoff et al., 2004).

La modification post-transcriptionnelle provoquée par l'hydroxylation des résidus prolines permet la formation d'un complexe d'ubiquitinylation, constitué de l'E3-ubiquitin ligase von Hippel-Lindau (VHL), de la cullin 2, et des protéines elongin B et C. Ainsi, en présence d'oxygène, cette protéine VHL permet la reconnaissance de la sous-unité HIFα, induisant la polyubiquitination de HIFα sur plusieurs résidus lysine conservés et sa dégradation très rapide par le protéasome 26S (Kamura et al., 2000; Ohh et al., 2000; Paltoglou & Roberts, 2007).

En situation d'hypoxie, les enzymes PHD, dont l'activité dépend de la réduction du fer et de l'O₂, deviennent inactives (Kaelin, 2005), ce qui permet la stabilisation de HIF1α et son transport dans le noyau par translocation nucléaire où elle se liera à la sous-unité β ainsi qu'à certains co-facteurs comme le p300/CBP. Le complexe HIF-1 ainsi constitué permettra la transcription des gènes cibles de HIF (Figure 24).

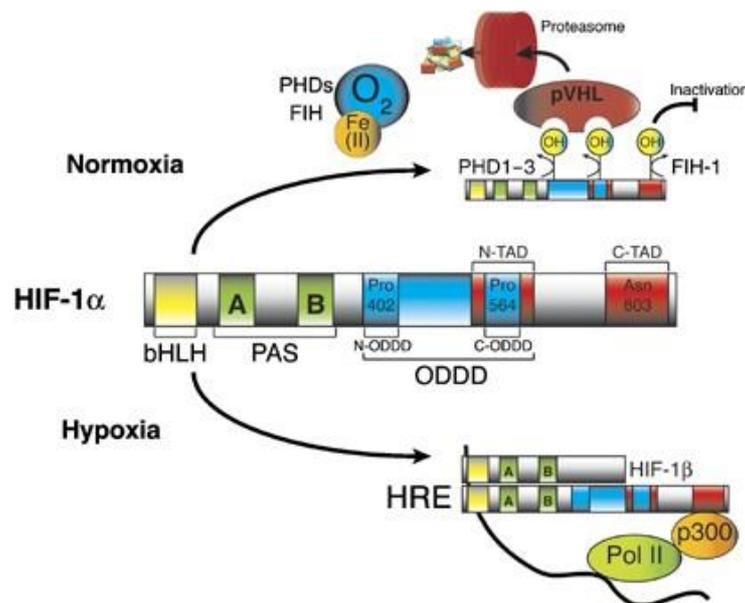


Figure 24. Schéma de la régulation de la protéine HIF-1α. Ce schéma représente la dégradation et la stabilisation de HIF, tiré de l'article « Biology of HIF-1α » (Weidemann & Johnson, 2008).

3.3. La régulation du métabolisme des cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques

Le gradient d'O₂ joue un rôle crucial dans la régulation des CS qui sont sensibles aux niveaux d'O₂ *in vivo* comme *in vitro*, et HIF est une protéine essentielle dans leur régulation métabolique et fonctionnelle. HIF favorise la glycolyse anaérobie plutôt que la phosphorylation oxydative dans des environnements hypoxiques, permettant aux CS de produire de l'énergie de manière efficace en conditions de faible oxygénation et de maintenir leur état de quiescence. HIF-1 α augmente l'activité glycolytique des cellules via l'activation des gènes codants les transporteurs de glucose (GLUT1), les enzymes glycolytiques telle que la LDH et les enzymes de régulation métabolique telle que la PDK1 (Iyer et al., 1998). Ce changement métabolique est orchestré par l'activation de HIF1 α via le facteur de transcription Meis1 (Simsek et al., 2010). Les résultats indiquent que les souris génétiquement modifiées pour le gène Meis1 montrent une régulation négative de HIF1 α et HIF2 α , entraînant une activation du métabolisme mitochondrial aérobie. Cela se traduit par la perte de la capacité des CSH à repeupler la MO (Kocabas et al., 2012), une augmentation de la production de ROS, et l'induction de l'apoptose des LT-CSH (Takubo et al., 2010).

Donc HIF-1 α a un impact significatif sur le métabolisme des CSH et régule également leur cycle cellulaire. Mais le nombre de cibles potentielles de HIF-1 α dans les CSH suggère qu'il peut influencer divers autres processus comme la régulation de la migration et de la mobilisation. Si l'adhésion à une niche est nécessaire à leur maintien, les CSH peuvent tout de même migrer vers d'autres tissus. HIF-2 α , comme HIF-1 α , contrôle l'expression de SDF-1 (et de son récepteur CXCR4 (Ben-Shoshan et al., 2008; Fang et al., 2009; Y.-L. Liu et al., 2006). Cette chimiokine, présente dans le microenvironnement de la MO, un rôle majeur dans la capacité de mobilisation des CSH (Chapitre 1).

Un défaut de fonction de PDH2 conduit à une augmentation de l'auto-renouvellement des CSH (R. P. Singh et al., 2013). *In vivo*, une stabilisation du taux de HIF-1 α par des inhibiteurs de la PDH2 augmente la capacité de repopulation de la MO chez les souris (Forristal et al., 2013). Cette augmentation est également observée chez les souris présentant un défaut de HIF1 α (Takubo et al., 2010). La concentration en O₂ peut influencer le potentiel des CS. La régulation négative de HIF-1 α se fait par la cytokine CITED2, ainsi le taux de HIF1 α est stabilisé et reste élevé ce qui est essentiel car sa suppression altère la capacité de reconstitution des CSH (Du et al., 2012). De plus, une exposition à des concentrations d'oxygène à 1 % ou la surexpression de HIF régule la quiescence des CSH en activant le facteur d'arrêt du cycle cellulaire, TGF- β (Wierenga et al., 2014).

A noter que le profil énergétique hypoxique des CS n'est pas uniquement dû à leur emplacement, mais également à la stabilisation de HIF-1 α par d'autres mécanismes et à l'activation de PDK. Cette

activation permet aux cellules de résider dans la niche, ayant une faible concentration en O₂, tout en étant proches des vaisseaux sanguins (Bourke et al., 2009). Les populations enrichies en LT-CSH présentant un profil glycolytique ne sont pas corrélées à la proximité aux vaisseaux sanguins ni avec la position dans certaines phases du cycle cellulaire. Les CSH qui ne se divisent pas (en G0) présentent un profil hypoxique similaires à ceux de la phase G1 du cycle cellulaire (Nombela-Arrieta et al., 2013).

Hyun Jik Lee et ses collaborateurs ont identifié une nouvelle voie induite par l'hypoxie qui favorise la prolifération et la migration des CSM humaines, mettant en jeu HIF-1 α , l'acide gras synthase (FAS) et la cible mammifère de la rapamycine (mTOR). Le traitement en conditions hypoxiques stimule la multiplication des CStroM de cordon ombilical (USP-CStroM) et augmente l'expression de deux enzymes impliquées dans la production de lipides : la FAS et la stéaroyl-CoA désaturase-1 (SCD1) (H. J. Lee et al., 2015). L'expression de FAS induite par l'hypoxie est régulée par la voie HIF-1 α /SCAP/SREBP1. De plus, l'hypoxie conduit à la phosphorylation de mTOR, et l'inhibition de FAS par la céruléine supprime cette phosphorylation de mTOR déclenchée par l'hypoxie, ainsi que la prolifération et la migration des USP-CStroM. En outre, FAS, stimulé par l'hypoxie, favorise la production d'AG libres, ainsi que la prolifération et la migration cellulaire. Plusieurs études ont suggéré que les acides gras saturés et leurs dérivés inhibent la phosphorylation oxydative dans divers types cellulaires (Brustovetskiï et al., 1991; Samartsev et al., 2002; Ventura et al., 1995).

D'autres recherches ont également suggéré que la modification des ratios de métabolites cellulaires tels que NADP/NADPH, sous l'influence de l'hypoxie, joue un rôle essentiel dans la régulation de diverses fonctions des CS, notamment le cycle cellulaire et les activités d'auto-renouvellement (Cipolleschi et al., 2014; Marzi et al., 2013).

Ces résultats révèlent que le profil hypoxique des CS médullaires est régi par des mécanismes cellulaires spécifiques, mais peut également être influencé par l'environnement hypoxique de leur niche. Cette double protection contribue au maintien du pool de CS.

Dans les environnement anoxiques ou ischémiques, il existe des formes de vie ressemblant à celles existantes à l'aube du développement de la vie sur la terre. Ces organismes, des protistes anaérobies ou facultativement anaérobies, des parasites, des cellules extraites de différents tissus somatiques de mammifères ou encore diverses cellules cancéreuses en plus de la glycolyse anaérobie emploient des mécanismes biochimiques de « sauvetage » qui leur assurent une survie cellulaire.

Avant d'aborder ces mécanismes de sauvetage, nous allons tout d'abord décrire l'état d'anoxie et d'ischémie dans les cellules humaines sur le plan physiologique et métabolique.

CHAPITRE 4 : METABOLISME CELLULAIRE EN ANOXIE ET ISCHEMIE

1. DEFINITION

L'anoxie est l'insuffisance d'apport d'oxygène aux organes et aux tissus vivants.

L'ischémie est un état de stress pathologique prenant place lorsque l'apport sanguin vers un organe est interrompu. En effet une artère obstruée empêche l'apport en oxygène et nutriments et s'ensuit une série de changements drastiques métaboliques et biochimiques. Elle provoque un déséquilibre entre l'apport et la demande d'oxygène dans les cellules de l'organe impacté. Chez l'homme, il existe plusieurs types d'ischémie qui peuvent affecter différents organes ou systèmes comme l'accident vasculaire cérébrale (AVC) ou la crise cardiaque. Les maladies cardiovasculaires sont, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la cause la plus fréquente de mort prématuré. D'année en année, le nombre de mort causé par ces maladies augmentes. On compte environ 18% de mortalité en 2019 contre 12% il y a 20 ans ([Arnett et al., 2019](#)).

2. ETAT SYSTEMIQUE DE L'ANOXIE ET DE L'ISCHEMIE

Il est très difficile de distinguer l'état d'anoxie de l'état d'ischémie chez l'humain quand on prend en considération un organisme entier. L'anoxie et l'ischémie sont connectées avec un manque d'irrigation des organes par le blocage de la circulation sanguine. Cet état entraine une anoxie tissulaire et irrémédiablement se transforme en ischémie par manque d'apport des substrats essentiels par la circulation sanguine. Il est donc dur de trouver des exemples d'état pathologique systémique en anoxie sans se référer à l'ischémie.

Pour ce qui concerne les dommages cellulaires, nous allons décrire ce qu'il se passe en ischémie.

L'interruption de la circulation sanguine entraine une perturbation de la balance entre demande et apport d'O₂ et de nutriments. D'un point de vue cellulaire, ces changements induisent une hypoxie locale, une accumulation de sous-produits cellulaires et une acidification de l'environnement cellulaire ([Dua & Lee, 2016](#); [Eltzschig & Eckle, 2011](#); [Slegtenhorst et al., 2014](#)).

2.1. Les dérégulations ioniques

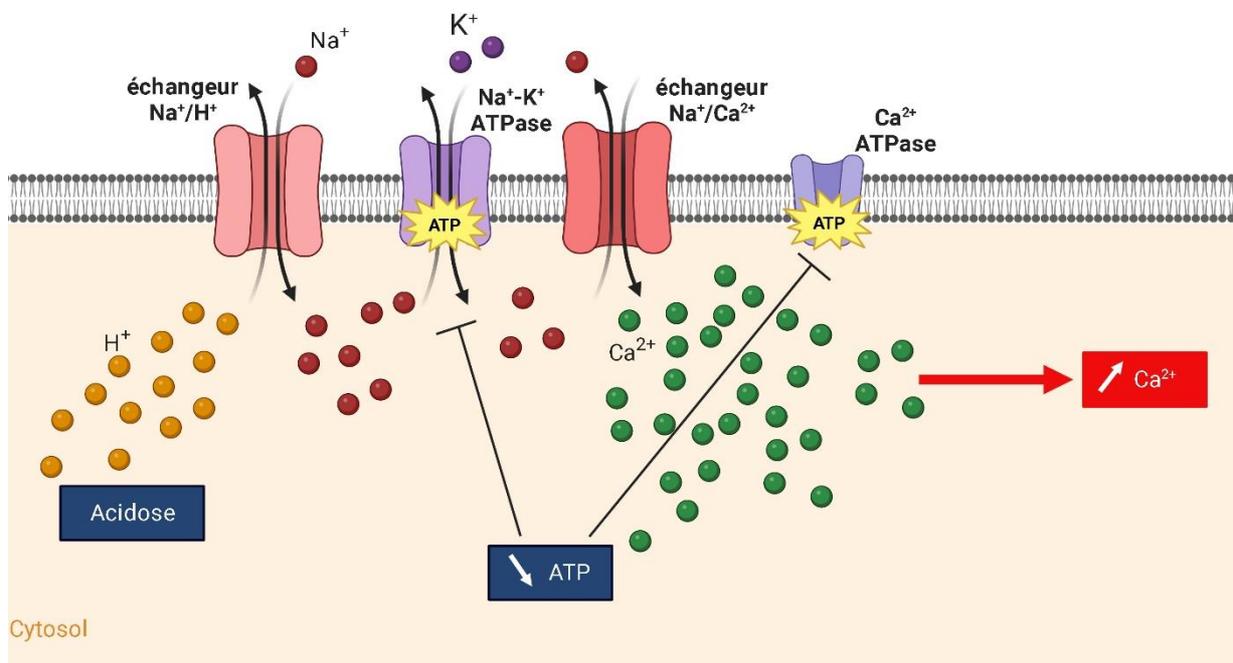


Figure 25. Schéma des dérégulations ioniques lié aux atteintes cellulaires ischémiques.

L'absence d'oxygène provoque le découplage des oxydations phosphorylantes et la synthèse d'ATP tombe à des niveaux critiques. La réduction de la concentration d'ATP devient quasi complète après 40-60 minutes d'ischémie (E. Murphy & Steenbergen, 2008). L'accumulation de lactate dû à l'activation de la glycolyse en mode anaérobie entraîne une diminution du pH intracellulaire. L'échangeur de sodium/proton (Na⁺/H⁺) excrète les ions hydrogène en excès, ce qui produit un afflux important d'ions sodium (Sanada et al., 2011). Le niveau d'ATP étant critique, les enzymes ayant une activité dépendante de l'hydrolyse de l'ATP (ATPase), tels que la Na⁺/K⁺ sont inactivées. L'efflux d'ion calcium (Ca²⁺) est réduit et n'est plus recapturé par le réticulum endoplasmique (RE), produisant ainsi une surcharge de calcium cytosolique (Figure 26). Au début, la recapture du calcium par la pompe du réticulum cytoplasmique (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase; SERCA) permet de limiter cette surcharge calcique cytosolique en utilisant les faibles quantités d'ATP encore présentes. Cependant, si l'ischémie perdure, les pompes dépendantes de l'ATP sont inhibées par l'arrêt de production d'ATP, entraînant une accumulation rapide de calcium cytosolique (Steenbergen et al., 1987).

En parallèle, la concentration en Ca²⁺ mitochondrial va augmenter puisque la mitochondrie pompe le Ca²⁺ cytosolique en excès. Cet excès de Ca²⁺ s'accompagne de l'ouverture du pore de transition de

perméabilité mitochondriale (mPTP), qui dissipe le potentiel de la membrane mitochondriale et altère davantage la production d'ATP (Kalogeris et al., 2012).

2.2. Déclenchement de la mort cellulaire

Ces altérations et donc le degré de lésion tissulaire varient en fonction du degré de diminution de l'apport sanguin et de la durée de la période ischémique (Bulkley, 1987).

La surcharge calcique au niveau des mitochondries joue un rôle crucial dans le déclenchement de facteurs pro-apoptotiques, ce qui induirait la mort cellulaire.

Lorsque l'homéostasie calcique du cytosol est perturbée, des protéines appelées calpaïnes deviennent suractivées, entraînant leur translocation vers la membrane plasmique (Zatz & Starling, 2005). Elles vont alors hydrolyser des protéines telles que l' α -foldrine et l'ankyrine, qui sont à l'origine du réseau tridimensionnel du cytosquelette. De plus, les fortes quantités de Ca^{2+} cytosolique peuvent induire l'activation de différentes enzymes telles que les phospholipases, les protéases et les endonucléases. Les phospholipases Ca^{2+} -dépendantes dégradent les phospholipides membranaires, ce qui fragilise la membrane cellulaire et prédispose les cellules à la mort par nécrose (Figure 27).

L'ensemble de ces stress va également entraîner la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. Les protéines de la famille Bcl-2, qui jouent un rôle fondamental dans l'intégration des signaux pro- et anti-apoptotiques, sont également affectées par les perturbations calciques. Il a été montré que Bcl-2 et Bcl-x_L régulent la libération de calcium du RE (Scorrano et al., 2003). Lors de l'ischémie, l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-apoptotique est perturbé. Initialement, Bcl-2 inhibe Bax et d'autres protéines pro-apoptotiques. Lorsque des perturbations se produisent, Bax se lie à la membrane interne mitochondriale, favorisant la libération du cytochrome c (Yang et al., 1997). Une fois que le cytochrome c est libéré et que le pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) est ouvert, un complexe appelé apoptosome se forme. Cet apoptosome est composé de la protéine Apaf-1, de caspases et de deux molécules de cytochrome c. L'apoptosome active la pro-caspase-9 (P. Li et al., 1997), qui à son tour active les caspases-3 et 7, entraînant finalement la mort des cellules par apoptose (Teringova & Tousek, 2017).

Le terme « mort cellulaire programmée » a longtemps été utilisé comme synonyme d'apoptose, tandis que l'on pensait que la mort cellulaire nécrotique était un phénomène se produisant « de manière aléatoire ». La découverte de voies de signalisation pouvant induire une nécrose régulée a permis de catégoriser un nouveau type de mort cellulaire nécrotique régulée appelée nécroptose (Vandenabeele et al., 2010). Cette voie est indépendante des caspases et permet donc d'aider à la défense contre les agents pathogènes porteurs d'inhibiteurs de caspase. Les atteintes cellulaires liés à l'ischémie provoque l'activation des récepteurs de mort TNF α receptor (TNFR) et les Toll-like (TLR) qui sont les

récepteurs de l'immunité inné qui reconnaissent les motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP) tels que des fragments d'acides nucléiques ou des nucléotides (ATP, Uridine diphosphate) (Couzinet et al., 2002). La liaison aux récepteurs provoque l'assemblage des kinases intracellulaires, Receptor Interacting Protein kinase 1 (RIPK1) et Receptor Interacting Protein Kinase 3 (RIPK3) en une plateforme intracellulaire de haut poids moléculaire appelée nécrosome. Ce complexe recrute et phosphoryle la pseudokinase de type domaine kinase de lignée mixte (MLKL). La phosphorylation est l'étape critique de l'activation du MLKL, induisant un changement de conformation, un désengagement du nécrosome et un assemblage en oligomères pro-nécroptotiques. Les oligomères MLKL sont acheminés du nécrosome vers la membrane plasmique, où ils s'accumulent et tuent les cellules une fois qu'un seuil de phospho-MLKL est dépassé (Bertheloot et al., 2021). De nombreuses molécules inflammatoires libérées au cours de la nécroptose favorisent la mort des cellules nécroptotiques et l'inflammation (H. Nakano et al., 2022), créant une boucle d'auto-amplification appelée nécroinflammation (Linkermann et al., 2014).

Une dernière forme de mort cellulaire programmée est appelée pyroptosis, qui est une forme inflammatoire de mort cellulaire déclenchée par des capteurs intracellulaires qui détectent les DAMP, les perturbations membranaires, les déséquilibres osmotiques et les efflux d'ions, entre autres stimuli. Lors de l'activation, ces capteurs recrutent la protéine ASC, formant une structure de la taille d'un micron appelée inflammasome. Ces structures activent la caspase-1 qui clive les proformes des cytokines de la famille de l'interleukine-1, IL-1 β et IL-18. La caspase-1 active également la gasdermine D (GSDMD), démasquant le domaine N-terminal, qui forme des pores dans la membrane plasmique, permettant à son tour la libération d'IL-1 β et d'IL-18 matures et provoquant un gonflement cellulaire et la pyroptose (Bertheloot et al., 2021).

En conséquence, l'augmentation des taux de calcium intracellulaire et mitochondrial entraînent le gonflement et à la rupture des cellules, ainsi que la mort cellulaire par des mécanismes nécrotiques, apoptotiques et autophagiques (C. Bompotis et al., 2016).

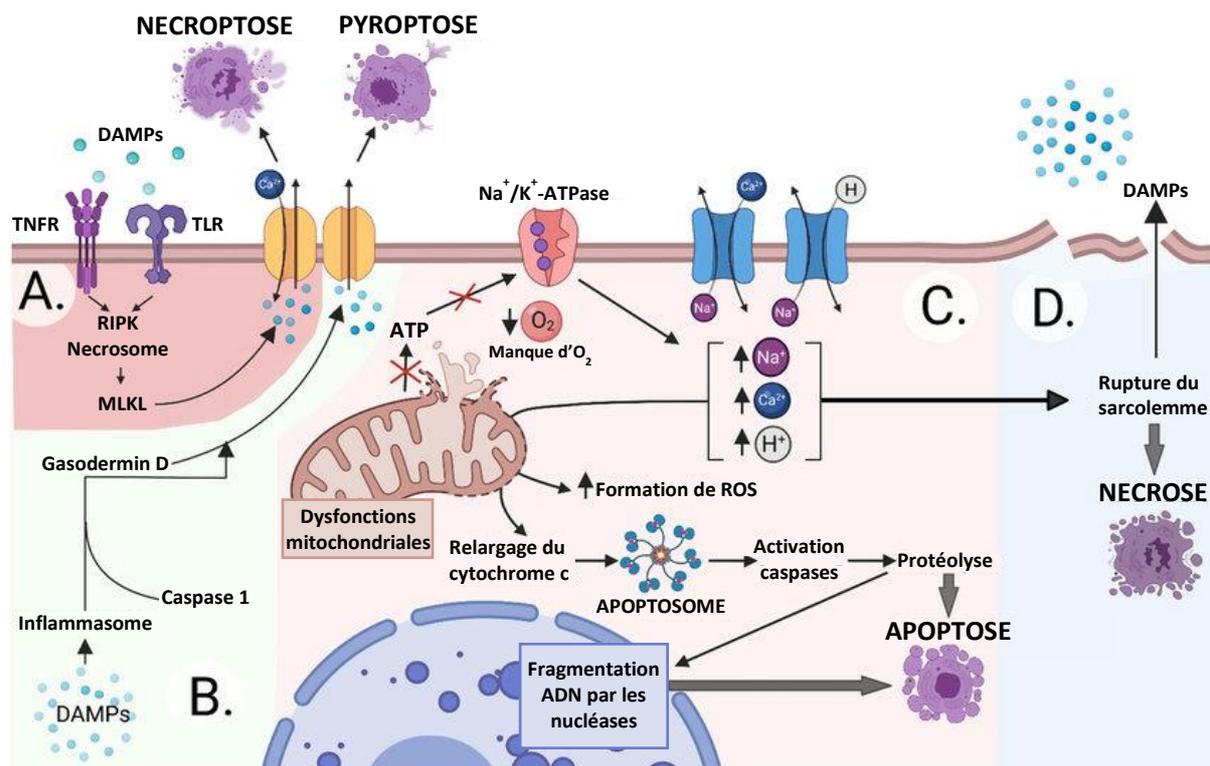


Figure 26. Schéma des différentes formes de mort cellulaire liées aux atteintes ischémiques. Schéma adapté de l'article « Impact of the Main Cardiovascular Risk Factors on Plasma Extracellular Vesicles and Their Influence on the Heart's Vulnerability to Ischemia-Reperfusion Injury » (Majka et al., 2021).

2.3. Les dérégulations du métabolisme cellulaire

2.3.1. Les changements glycolytiques

En absence d' O_2 , les cellules ne peuvent plus utiliser les OxPhos, la genèse d'ATP est alors assurée par la glycolyse à partir des stocks cellulaires de glycogène et de glucose (Allard et al., 1994). La cellule augmente l'absorption de glucose qui devient la principale source d'énergie. Dans un modèle canin, on a observé une augmentation de l'absorption de glucose à partir de la circulation sanguine et par le biais d'une augmentation d'expression sarcoplasmique des transporteurs de glucose à haute affinité GLUT-1 et GLUT-4 (Brosius et al., 1997). Ce tournant métabolique entre la β -oxydation et la glycolyse anaérobie est médié par « l'AMP-activated protein kinase » (AMPK). L'AMPK est reconnu comme étant un moniteur de l'énergie cellulaire, en contrôlant la concentration en AMP et ADP (Hardie & Carling, 1997). L'AMPK joue un rôle clé en activant lui aussi la translocation du transporteur de glucose GLUT-4 (Russell et al., 2004). L'AMPK est activé par la carence en glucose (S.-C. Lin & Hardie, 2018), et phosphoryle la PFK-2, entraînant une augmentation du fructose-2,6-bisphosphate intracellulaire, un puissant stimulateur allostérique de la PFK-1 (Diakos et al., 2016; Lei et al., 2004; Marsin et al., 2000). Des souris déficientes en AMPK présentent des perturbations métaboliques intracellulaires et lésions

myocardiques plus graves en réponse à l'ischémie par rapport au type sauvage (Russell et al., 2004). Cette activité accrue de la PFK1 est aussi dû à la levée de l'inhibition de la PFK1 par le citrate (Zuurbier et al., 2020).

La diminution de l'ATP intracellulaire et du G6P, l'augmentation du rapport lactate/pyruvate dû à la fermentation engendrée par le manque d'O₂ et l'augmentation de l'AMP intracellulaire et de la concentration en phosphate inorganique activent une phosphorylase kinase qui catalyse la conversion de la glycogène phosphorylase b en sa forme active, glycogène phosphorylase a. Cette réaction en cascade conduit à une consommation intense et rapide de glycogène (Schaefer & Ramasamy, 1997). On observe donc une accélération rapide de la conversion du pyruvate en lactate via la lactate déshydrogénase et de la régénération du NAD⁺ à partir du NADH dans le but de maintenir la glycolyse anaérobie. L'hydrolyse de l'ATP dérivé de la glycolyse en l'absence d'oxydation ultérieure du pyruvate conduit à une accumulation de lactate et de protons (Dennis et al., 1991; Robergs et al., 2004), ce qui peut aggraver davantage les perturbations intracellulaires provoquées par l'ischémie que nous avons décrits en amont.

Cependant, cette augmentation de la glycolyse est insuffisante pour compenser complètement le déficit énergétique de l'insuffisance cardiaque ou pour restaurer la fonction cardiaque. Cela est en partie dû au fait que la glycolyse ne produit que deux molécules d'ATP par molécule de glucose, contre 31 molécules d'ATP qui auraient été produites si le pyruvate issu de la glycolyse avait été oxydé.

2.3.2. Les changements au niveau du métabolisme des acides gras et de la β -oxydation

Au cours de l'ischémie, on observe donc un passage de l'oxydations de AG vers la glycolyse médiée par l'AMPK. L'ischémie totale entraîne l'inhibition des OxPhos et une accumulation d'équivalents réducteurs sous forme de NADH et de FADH₂ (Neely & Feuvray, 1981). Les réactions enzymatiques effectuées par l'acylCoA déshydrogénase et la 3-hydroxyacylCoA déshydrogénase de la β -oxydation sont toutes deux sensibles à l'état rédox (rapports NAD⁺/NADH et FAD/FADH₂) et se retrouvent inhibées (Neely & Morgan, 1974). L'inhibition de la β -oxydation entraînent l'accumulation d'intermédiaires des réactions tels que l'acyl-carnitine et l'acyl-CoA (Idell-Wenger et al., 1978). Ces accumulations favorisent la perturbation de la structure de la mitochondrie, des changements qui peuvent finalement perturber la fonction mitochondriale (Jennings & Reimer, 1991). Ici encore l'AMPK est à l'origine d'une diminution de la teneur en malonyl-CoA. Ceci a été montré dans des modèles d'ischémie de cœur de rat (Kudo et al., 1995). Cette diminution et la forte concentration en AG libre, provoquera des conséquences délétères au cours de la reperfusion.

2.3.3. Les changements au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les atteintes de la CRM lors de l'ischémie suivent le même modèle que les reste des dégradations cellulaires lors de l'ischémie. L'intensité des dommages dépend de la durée de l'ischémie (Veitch et al., 1992). Au-delà de 60 min (E. Murphy & Steenbergen, 2008), la mitochondrie subit des changements structuraux qui entraînent la mort cellulaire par apoptose. Dans les premières minutes qui suivent l'ischémie, on observe une diminution de l'activité du CI de la CRM et une atteinte des cardiolipines (CL) (Paradies et al., 2004; Sadek et al., 2004). Les CL sont des phospholipides présents exclusivement dans la membrane mitochondriale, jouant un rôle essentiel dans divers processus liés à la bioénergétique mitochondriale, ainsi que dans la stabilité et la dynamique de cette membrane. La dégradation des cardiolipines par peroxydation lipidique (due aux ROS) peut être responsable de cette altération du CI (Fry & Green, 1981). Les CL sont nécessaires au transfert des électrons au sein des complexes I, III et IV et leur diminution joue dans la diminution de leur activité (Lesnefsky et al., 1997, 2001; Petrosillo et al., 2003). Plus l'ischémie se poursuit, plus le CI est endommagé, et plus la perturbation atteint les complexes en aval (Q. Chen et al., 2008). Au niveau du CIII, l'ischémie altère l'intégrité du centre Fer-Soufre en modifiant la conformation de la protéine de Rieske (Lesnefsky et al., 2001). Quand à l'ATP synthase, des chercheurs ont montré que pendant l'ischémie l'activité de l'ATPase passe de la synthèse à l'hydrolyse de l'ATP (Lesnefsky et al., 2017).

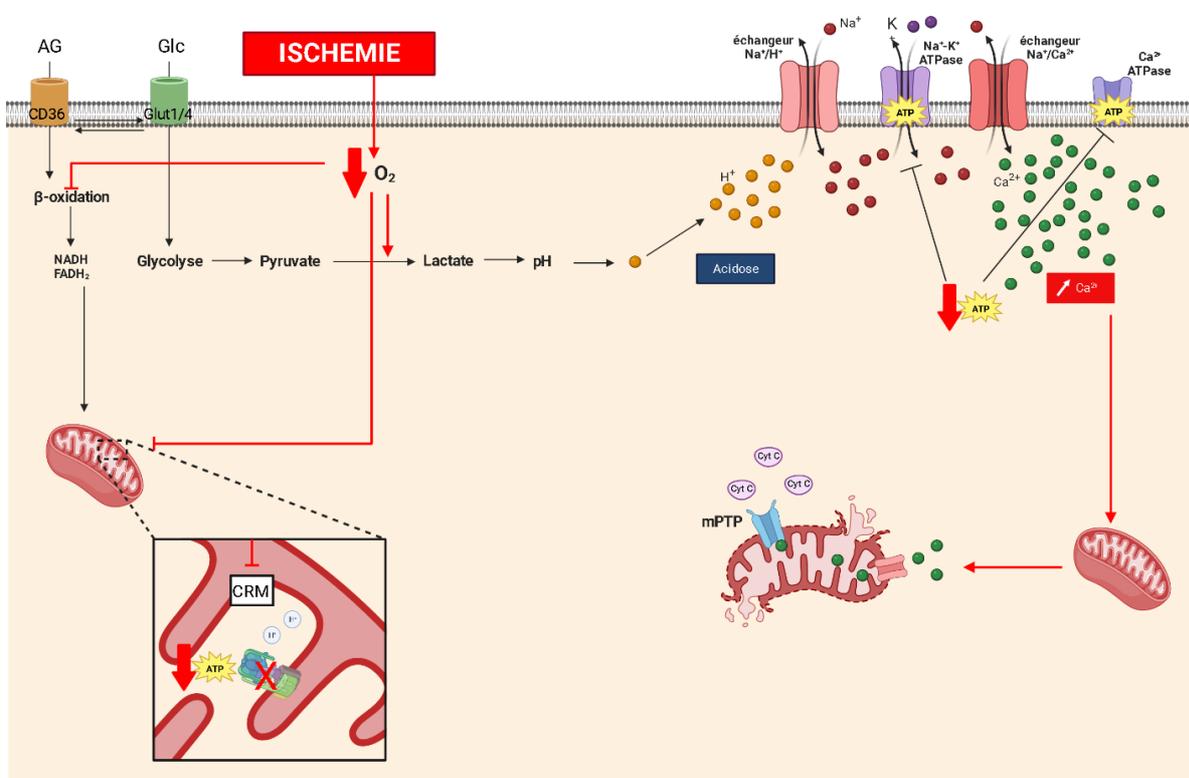


Figure 27. Schéma des conséquences métaboliques de l'ischémie. Les perturbations métaboliques entraînent de manière concomitante les perturbations ioniques décrites dans la première partie du chapitre 4.

On a vu une libération du cytochrome c oxydase médié par Bax. De plus, les mitochondries libèrent du Cyt-c (Borutaite et al., 2001) car la cytochrome c oxydase ne consomme pas rapidement tout l'oxygène résiduel (Ilangovan et al., 2004; X. Zhu & Zuo, 2013).

En revanche, le CII est relativement résistant aux dommages ischémiques (Lesnefsky et al., 1997). Ces résultats sont venus appuyer ce qui avait été découvert chez les cellules cancéreuses ou l'enzyme SDH commune au cycle de Krebs et à la CRM qui convertit le succinate en fumarate, est capable de fonctionner de manière inverse. La NADH-Fumarate reductase (FDH) permet alors la conversion de fumarate en succinate (Tomitsuka et al., 2010). Cette inversion avait déjà été montrée chez les organismes anaérobiques (M. Müller et al., 2012), et que l'activité de cette enzyme mitochondriale augmentait provoquant une accumulation de succinate. Par ailleurs, l'accumulation de succinate est considérée comme une signature métabolique universelle de l'ischémie. L'accumulation de succinate a été montrée en ischémie (Chouchani et al., 2014), dans les cellules cancéreuses exposées à l'hypoxie (Dalla Pozza et al., 2020) et dans les muscles après un exercice (Lewis et al., 2010).

3. Le succinate, marqueur de l'ischémie

Chez l'humain, le succinate est impliqué dans une trentaine de réaction l'impliquant en tant que substrat ou produit dans différents compartiments cellulaires. Cependant toutes les réactions, impliquant la modification de la concentration en succinate au cours de l'ischémie, ont lieu dans la mitochondrie. La production de succinate provient majoritairement du cycle de Krebs, et son utilisation principale intervient au niveau du CII de la CRM. Cette enzyme appelée succinate déshydrogénase, peut également effectuer la réaction inverse et est alors un système connue sous le nom de NADH-fumarate réductase (FDH), qui existe dans les organismes anaérobies, tels que les parasites (Kita et al., 2002). Ce système dont nous avons déjà parlé a été observé chez l'humain dans les CSC soumis à des environnements ischémiques (Tomitsuka et al., 2010). Après la découverte de cette enzyme, on pourrait penser que le succinate s'accumule par la réaction de la FDH, mais les différentes études effectuées depuis les années 1920-1930 montrent que l'origine de cette accumulation provient de l'activité canonique du cycle de Krebs (Krebs, 1936; Moyle, 1924; Needham, 1927; Weil-Malherbe, 1936). En 1949, F.E. Hunter montre que dans un modèle de rat anoxique pour le rein et le foie, l' α -KG est oxydé en succinate et CO_2 , tandis que l'OAA est réduit en malate (Hunter, 1949). Il décrit que l' α -KG est transformé en succinyl-CoA qui est lui-même transformé en succinate et que cette réaction produit de l'ATP par phosphorylation de substrat (Chinopoulos et al., 2010). Depuis ce système a aussi été observé dans les modèles *in vivo* de cœur ischémiques où la concentration augmentaient de 3 à 19 fois par rapport à un cœur perfusé en normoxie (61-729 ng/mg poids sec)

(Chouchani et al., 2014). Edward Chouchani a montré par le biais d'isotope radioactif que l'accumulation de succinate venait de la production de fumarate et que ce dernier proviendrait alors de deux voies convergentes : la navette malate/aspartate (MAS) et le cycle des nucléotides puriques (PNC). La MAS est un mécanisme de transport de molécules chez les eucaryotes à travers la membrane mitochondriale interne afin de transférer le NADH produit par la glycolyse, du cytosol vers la matrice mitochondriale, en régénérant du NAD⁺ dans le cytosol. Ces mécanismes utilisent des antiports de la membrane interne mitochondriale, le transporteur glutamate-aspartate et le transporteur malate/ α -KG. Le système fonctionne avec un flux net d'électrons du cytosol vers la matrice mitochondriale qui est suffisant pour maintenir à la fois la glycolyse et l'oxydation du lactate, et ainsi empêcher la production nette de lactate. Cependant, pendant l'ischémie, il y a une diminution de la réduction de l'O₂ par les électrons au niveau CIV, ce qui conduit à l'inhibition du transfert de NADH dans la matrice via la MAS, entraînant un passage de l'absorption de lactate à la production de lactate et une augmentation du ratio NADH/NAD⁺ conduisant à la formation de malate converti en fumarate. Le deuxième système est le cycle des nucléotides puriques qui est une voie métabolique produisant du fumarate à partir d'aspartate et est AMP-dépendant. D'autres études ont confirmé que l'inhibition du CII et du cycle des nucléotides puriques n'impactaient pas l'accumulation du succinate (J. Zhang et al., 2018). Les expériences menées par Zhang montrent que seulement une infime partie (~6%) vient du fumarate via l'utilisation du CII de la CRM. Mais il faut garder à l'esprit que chaque réaction métabolique est interconnectée pour assurer l'équilibre et qu'il se pourrait que l'inhibition de certaines voies provoquent une augmentation d'une autre d'où l'observation d'une accumulation toujours présente après inhibition.

Donc l'ischémie entraîne une insuffisance énergétique cellulaire, la dépolarisation de la membrane avec une perte d'homéostasie ioniques due à l'augmentation du calcium intracellulaire, une inhibition de la synthèse protéique, une acidose due à l'accumulation de déchets métaboliques ne pouvant être relargué dans la circulation (exemple du lactate), une excitotoxicité, toxicité médiée par les radicaux libres, et une inflammation. Sans restauration du flux sanguins, les cellules nécrosent, entraînant la mort du tissu et du patient. Cependant, certains organismes, même humain, parviennent à adapter leur métabolisme pour survivre aux manques d'O₂ et de nutriments.

4. LES ADAPTATIONS METABOLIQUES A L'ANOXIE ET L'ISCHEMIE

4.1. Les stratégies d'adaptations métaboliques des organismes à l'anoxie

4.1.1. Les stratégies d'adaptations métaboliques des organismes anaérobies

La production énergétique dans des conditions anaérobies est un phénomène largement retrouvé dans de nombreux organismes comme les bactéries, les algues, les parasites et un bon nombre d'organismes eucaryotes comme des vers, vivant dans des environnements anoxiques (M. Müller et al., 2012).

La voie Embden-Meyerhof, qui dégrade le glucose en pyruvate par oxydation, constitue la base de la synthèse de l'ATP chez les eucaryotes (M. Müller, 2003). Comme on l'a décrit, cette dégradation du glucose, ainsi que d'autres composés organiques, génère des cofacteurs réduits tels que le NADH et le FADH₂, qui sont réoxydés en transférant des électrons à un accepteur terminal. Cet accepteur terminal, sous forme réduite, est ensuite excrété sous forme de produit final métabolique (déchet). Les cofacteurs réduits peuvent être réoxydés de deux manières : par respiration et par fermentation.

La respiration anaérobie la plus courante chez les eucaryotes implique le fumarate, bien que ce ne soit pas strictement de la respiration, car le fumarate (l'accepteur final d'électrons) est généré à l'intérieur de l'organisme pendant le métabolisme, ce qui en fait une forme de fermentation (même si elle implique la génération d'un gradient de protons). Les fermentations sont bien plus fréquentes chez les eucaryotes anaérobies, où les électrons sont transférés à des accepteurs terminaux produits au sein de l'organisme, tels que le pyruvate (pour la production de lactate et/ou d'opines), l'acétaldéhyde (pour la production d'éthanol), le fumarate (pour la production de succinate), les protons (pour la production d'hydrogène), ou l'acétyl-CoA (pour la production d'acides gras et de leurs dérivés). Ces fermentations conduisent à des réactions où le substrat organique est converti en un substrat plus réduit et une forme plus oxydée, comme la conversion du glucose en éthanol et CO₂. Par conséquent, les glucides sont des substrats appropriés pour la fermentation.

Il est important de noter que de nombreux eucaryotes vivent dans des environnements riches en oxygène, mais n'utilisent pas nécessairement l'oxygène pour la phosphorylation oxydative. En présence d'oxygène, certains organismes peuvent fermenter plutôt que d'utiliser l'O₂ comme accepteur terminal dans leurs mitochondries (Pronk et al., 1996; van Dijken & Scheffers, 1986; Van Urk et al., 1989), ce qui est observé, par exemple, chez la levure telle que *Saccharomyces cerevisiae*. Même en culture aérobie, les levures présentent souvent un mélange de respiration et de fermentation, à moins d'être soumises à des conditions de faible approvisionnement en sucre et à des taux de croissance spécifiques réduits (Bakker et al., 2001; Postma et al., 1989).

Le parasite responsable du paludisme, *Plasmodium falciparum*, a un métabolisme particulier. Bien que son métabolisme de base repose sur la fermentation du lactate (Olszewski & Llinás, 2011), il possède un système de transport d'électrons fonctionnel dans les mitochondries, principalement utilisé pour la biosynthèse de pyrimidine (Painter et al., 2007). Le transport d'électrons se faisant via la dihydroorotate déshydrogénase et l'ubiquinone.

Les poissons rouges, quand à eux, peuvent survivre à une anoxie complète en produisant de l'éthanol et du CO₂, grâce à des réactions de décarboxylation du pyruvate (Van den Thillart et al., 1983). Les enzymes responsables de la fermentation alcoolique sont la pyruvate décarboxylase (PDC) et l'alcool déshydrogénase (ADH). L'ADH a d'ailleurs une activité plus élevée, ce qui permet que le produit toxique de la réaction l'acétaldéhyde cytotoxique ne s'accumule pas (Verhagen, 1993).

De nombreux protistes anaérobies peuvent tolérer de faibles concentrations d'oxygène (de 3 à 30 µM) et certains croissent même plus rapidement en présence de faibles niveaux d'oxygène (Lloyd, 1996; Paget & Lloyd, 1990).

Ces observations suggèrent que les protistes vivant indépendamment de l'O₂ sont des « microaérophiles » plutôt que des « anaérobies » (Biagini & Bernard, 2000; Lloyd, 1996). Peu d'eucaryotes étudiés jusqu'à présent sont véritablement des anaérobies stricts, dans le sens où la plupart d'entre eux rencontrent régulièrement un peu d'O₂ dans leur habitat naturel. En conséquence, ils disposent de moyens biochimiques pour traiter l'O₂ et peuvent facilement le tolérer en petites quantités. Ainsi, l'O₂ est à la fois une toxine et un accepteur alternatif mineur pour atteindre l'équilibre redox chez de nombreux protistes anaérobies.

Un trait commun au métabolisme énergétique anaérobie chez certains animaux est que les mitochondries ne révèlent aucune différence fondamentale dans leurs répertoires enzymatiques comparés à ceux des organismes aérobies. Cette observation indique que le processus évolutif de spécialisation vers un mode de vie anaérobie chez les métazoaires est distinct du processus des protistes et conduit vers un spectre moins diversifié de produits finaux. Autrement dit, les espèces anaérobies détournent leur flux de carbone central grâce à des enzymes que possèdent également les espèces aérobies, mais en générant une gamme différente de produits finaux, shuntant et évitant le besoin de réactions d'oxydation terminales dépendantes de l'O₂.

4.1.2. Les stratégies d'adaptations métaboliques des organismes aérobies

Chez les hétérotrophes eucaryotes, la glycolyse est l'épine dorsale du métabolisme du carbone et de l'énergie. Au cours de la glycolyse, 1 mole de glucose est oxydée en 2 moles de pyruvate, avec un

rendement net de 2 moles d'ATP et produisant 2 moles de NADH. Chez les eucaryotes qui utilisent l'O₂ comme accepteur d'électrons terminal dans leurs mitochondries, le pyruvate est davantage oxydé dans les mitochondries via le complexe PDH, le cycle de Krebs et la respiration mitochondriale pour produire du CO₂ et de l'eau. Les eucaryotes spécialisés dans les environnements aérobies, tels que les plantes et les vertébrés, possèdent généralement de simples fermentations cytosoliques pour supporter un fonctionnement anaérobie à court terme, aboutissant à des produits finaux tels que le lactate, via la LDH, ou l'éthanol, via pyruvate décarboxylase (PDC) et l'ADH (Livingstone, 1991; Plaxton, 1996). Une autre variante de fermentation cytosolique se trouve chez plusieurs espèces de trichomonas et de levures, ce qui augmente leur production de glycérol en cas d'anoxie (Steinbüchel & Müller, 1986; Valadi et al., 2004). Dans ce cas, l'intermédiaire glycolytique dihydroxyacétone phosphate (DHAP) est converti en glycérol-3-phosphate par une glycérol-3-phosphate déshydrogénase qui dépend du NADPH dans les *trichomonas* (Steinbüchel & Müller, 1986) et du NADH dans la levure (Valadi et al., 2004) et est ensuite converti en glycérol par la glycérol-3-phosphatase. La production de glycérol à partir du glucose entraîne une consommation nette de NAD(P)H et est essentielle dans les cellules de levure qui ne peuvent respirer (Valadi et al., 2004).

Dans l'organisme humain, certaines cellules ont la capacité de proliférer dans des zones hypoxiques (<5% O₂). Ainsi, les CSC sont des sous-populations de cellules au sein d'une tumeur qui ont des caractéristiques similaires aux cellules souches normales, notamment la capacité d'auto-renouvellement et la capacité de se différencier en cellules spécialisées (Hemmati et al., 2003; Ivanovic & Vlaski-Lafarge, 2016; I. Nakano & Kornblum, 2006; S. K. Singh et al., 2003). De nombreuses études ont montré que les CSC de divers types de cancer ont tendance à favoriser la glycolyse, même en présence d'oxygène (effet Warburg). Otto Warburg a regardé la distribution entre la fermentation et la respiration mitochondriale et a découvert que les cellules tumorales utilisaient à 66% la fermentation et à 33% la respiration (Warburg, 1956). L'utilisation préférentiel de la glycolyse anaérobie devient alors pour la majorité une signature spécifique des cancers (Fernandes et al., 2012). Mais, comme nous avons montré dans la partie précédente, certains types de cellules normales tels que les CSE ou encore les CSA sont capables d'orienter leur métabolisme vers la glycolyse en mode anaérobie, et ce même en culture dans des conditions hyperoxiques. Donc cette programmation métabolique, qui a longtemps été associée à une propriété intrinsèque des cellules cancéreuses, est en réalité un déterminant important de la capacité souche des cellules (Ivanovic & Vlaski-Lafarge, 2016; Kohli & Passegué, 2014; Vlaski-Lafarge et al., 2020).

4.2. Les stratégies d'adaptations métaboliques en ischémie

Il a été montré chez certaines espèces anaérobiques comme *Arenicola Marina* (M. Müller et al., 2012), chez certains parasites ou chez les CSC un phénomène de respiration anaérobie mitochondriale. Souvent les tumeurs, en plus des micro-environnements hypoxiques, présentent des environnements hypoglycémiques dû au fait que les vaisseaux sanguins ne se développent pas de manière suffisante au sein des tumeurs (Hirayama et al., 2009; Zu & Guppy, 2004). Dans ces conditions ischémiques, le fumarate est utilisé comme accepteur final des électrons. Cette réaction est la réaction inverse de la transformation du succinate en fumarate pour le transfert des électrons à la chaîne respiratoire dans des conditions aérobiques (par l'enzyme succinate dehydrogenase) et est utilisé par la fumarate reductase (FRD). La réduction du fumarate est couplée à un transfert d'électrons du NADH du CI de la CRM au fumarate, ce qui lui permet de pomper des protons vers l'espace intermembranaires et qui pourront activer la force proto-motrice nécessaire à la formation de l'ATP par l'ATP synthase (Tomitsuka et al., 2010). L'accumulation de succinate, fumarate et malate dans les cellules cancéreuses et le fait que l'inhibiteur de la fumarate reductase, le pyrvinium pamoate, manifeste une activité anti-cancéreuse (Tomitsuka et al., 2012), permet de conclure qu'une activité mitochondriale en mode anaérobie est importante pour soutenir la croissance, en particulier cancéreuse. En effet, le métabolisme des CSC diffère souvent de celui des cellules tumorales différenciées mais est similaires aux cellules souches normales (Vlaski-Lafarge et al., 2020). Il a été montré que les cellules souches normales peuvent également survivre dans de telles conditions en adaptant leur métabolisme de manière similaire aux cellules cancéreuses. Cette caractéristique n'est pas la conséquence d'une transformation maligne, mais un attribut de la CS.

CHAPITRE 5 : THERAPIE CELLULAIRE : UTILISATION DE CELLULES SOUCHES

Il existe différents types de thérapies dans le cas des atteintes ischémiques, leur utilisation dépend de la forme clinique.

Malgré la résistance plus ou moins fortes de certaines cellules et les préventions de plus en plus importantes pour contrées ces atteintes cellulaires provoquées par ces conditions extrêmes d'oxygénation, les dégâts cellulaires restent plus ou moins étendus. L'utilisation de thérapies est nécessaire pour la réparation cellulaire/tissulaire des zones nécrotiques.

La thérapie cellulaire consiste à utiliser des cellules spécifiques pour traiter les dommages causés par un apport sanguin insuffisant à un tissu ou à un organe ou bien des atteintes pathologiques de ces organes. Cette approche vise à régénérer les tissus endommagés, à stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et à améliorer la fonction de l'organe affecté.

Les CSA sont des éléments très utilisés en médecine régénérative de par leur capacité à reconstitué des tissus.

1. LA GREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUE

Les CSH occupent une place prépondérante en raison de leur longue histoire d'exploration expérimentale, couvrant plus de 50 années d'études. Ces cellules souches présentent un potentiel significatif en médecine régénérative. La greffe de CSH multipotentes est actuellement la thérapie par cellules souches la plus répandue et la plus ancienne. Les cellules cibles sont généralement prélevées de la MO, du sang périphérique (SP) ou du cordon ombilical (USP, « unité de Sang Placentaire) ([Bron et al., 2002](#)). La collecte de CSH à partir de la MO implique l'aspiration de 700 à 1500mL (au maximum 15mL/kg) de moelle, généralement prélevée au niveau des crêtes iliaques postérieures du donneur, sous anesthésie locale ou générale. Pour la collecte du SP, le donneur est traité par des facteurs de croissance recombinants (GCSF, « granulocyte colony-stimulating factor » ou GMCSF, « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ») afin de stimuler la prolifération et la mobilisation des CSH de la MO. Si le nombre de cellules n'est pas satisfaisant il est possible d'utiliser une combinaison de facteur de croissance et de molécules (plerixafor) qui inhibent le lien entre les molécules CXCR4, CXCL12 et SDF-1 qui permet au CSH de se lier à la niche hématopoïétique ([Lidonnici et al., 2017](#)). Une aphérèse standard est effectuée 4 à 6 jours plus tard. Enfin le prélèvement de l'USP se fait après l'accouchement par clampage du cordon et prélèvement du sang du cordon une aiguille.

La greffe de CSH peut utiliser les propres cellules du patient, on parle alors de greffes autologues. La greffe allogénique implique un donneur et un receveur distinct et enfin la greffe syngénique utilise des cellules provenant d'un vrai jumeau. L'utilisation des greffes autologues et syngéniques permettent de limiter les réactions greffon contre hôte (GVHD).

La transplantation de CSH apporte des solutions aux problèmes liés aux dysfonctionnements du système hématopoïétique, notamment les maladies telles que la leucémie et l'anémie.

Cependant, il existe des limites significatives associées aux sources conventionnelles de CSH. Tout d'abord, le nombre de cellules transplantables est limité, et aucune méthode efficace de collecte n'a encore été découverte. De plus, trouver un donneur compatible sur le plan immunologique pour la transplantation peut poser des problèmes, et des complications liées à des infections virales ou des réactions immunitaires peuvent réduire l'efficacité des transplantations conventionnelles de CSH. En conséquence, la transplantation hématopoïétique est principalement réservée aux patients atteints de maladies potentiellement mortelles, compte tenu de sa complexité multifactorielle et de ses risques.

2. LA GREFFE DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES

Les NSC, les myoblastes squelettiques (SM), ainsi que les CStroM sont très pertinentes dans ce contexte. Par exemple pour la régénération myocardique, Les SM ont été le premier type de cellule testé, affichant un bon potentiel de greffe et de réparation (Memon et al., 2005). La réparation par les cellules souches NSC et CStroM a montré de nombreuses fois leur potentiel de régénération fonctionnelle par des mécanismes de neuroprotection, de remplacement cellulaire, de récupération de la myéline, de néovascularisation, et neurogenèse de novo (Bible et al., 2012; Kokaia & Lindvall, 2012; Lindvall & Kokaia, 2011). Les CSM, de par leur capacité à se différencier en différents types de cellules, y compris des cellules endothéliales (qui tapissent les vaisseaux sanguins) peuvent être injectées dans la région ischémique pour favoriser la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) en permettant un remodelage de la zone ischémique cardiaques (Hare et al., 2009). De plus, l'effet paracrine bénéfique a été montré dans des cellules stromales dérivés d'adipocytes (CSDA) (Mazo et al., 2012). C'est pour cela que les exosomes dérivés des CSDA ont suscités beaucoup d'intérêt. L'équipe de Jinxuan Zhao a montré chez la souris que l'utilisation de ces exosomes améliorerait le rétablissement post-ischémique grâce à la polarisation des macrophages M2 (J. Zhao et al., 2019). Mais les CSDA ne sont pas les seules sources d'exosomes étudiés ces dernières années. Des résultats prometteurs ont également été observés dans des modèles précliniques murins de lésions

ischémiques testant des exosomes dérivés des progéniteurs endothéliaux (Yue et al., 2020), de Macrophages M2 (Dai et al., 2020), de CStroM d'os (Scheda et al., 2021), de CSE et d'iPS (Gao et al., 2020; Khan et al., 2015) et de CStroM dérivées de la moelle osseuse (C. Xiao et al., 2018). Les effets protecteurs des exosomes englobent la réduction des processus typiques induits par l'ischémie tels que l'inflammation excessive par l'inhibition de kinase (Yue et al., 2020), de PKC δ , d'activation de protéine interagissant avec la thioredoxine (Dai et al., 2020) et enfin par la réduction des troubles de l'autophagie. Cependant, de nombreux problèmes ont limité jusqu'à présent leur utilisation dans la pratique clinique. Parmi les problèmes potentiels affectant l'efficacité des cellules souches on trouve la transformation néoplasique, la transdifférenciation indésirable, la quantité insuffisante, un éventuel rejet en cas d'allogreffes et la faible survie après transplantation. Leur efficacité d'action dépend en partie de la topologie de la lésion et site de transplantation. L'environnement du tissu hôte peut être très agressif pour les cellules greffées, comme par exemple dans le noyau ischémique comme ça a été montré chez le rat (Smith et al., 2012). En effet la zone péri-infarctus est une cible où le succès de la transplantation est plus importante (Ramos-Cabrer et al., 2011), cependant la survie des cellules transplantées est encore très faible, entraînant une faible efficacité de greffe (Sandvig et al., 2017), même si de telles stratégies sont très prometteuses, car elles peuvent aborder potentiellement plusieurs aspects de la pathologie des lésions liées à l'ischémie.

3. LA CULTURE DE CELLULES SOUCHES *EX VIVO*

La culture cellulaire *ex vivo* peut affecter la survie des cellules après la transplantation. L'efficacité de ces approches dépend en grande partie de la localisation de la lésion et du site de transplantation. Dans le cas d'atteinte anoxique et/ou ischémique, la greffe de CS cible généralement la zone de pénombre ischémique/péri-infarctus, où le microenvironnement du tissu hôte est moins agressif pour les cellules transplantées, plutôt que le noyau ischémique (Ramos-Cabrer et al., 2011; Smith et al., 2012). Malgré le fait que la pénombre ischémique représente un tissu récupérable, la survie des cellules transplantées est encore très faible, ce qui entraîne une faible efficacité de prise de greffe (Lindvall & Kokaia, 2011; Modo et al., 2013). Les approches d'ingénierie tissulaire *in situ* visent à résoudre ce problème en utilisant des matrices de biopolymères naturelles et synthétiques pour favoriser la survie des cellules greffées, ainsi que pour servir de support pour la régénération des lésions et la délivrance ciblée et contrôlée de produits pharmacothérapeutiques (Bible et al., 2012; Jendelová et al., 2016; Sandvig et al., 2015). Cependant, même si ces stratégies sont prometteuses dans leur capacité à traiter divers aspects des lésions accidentelles, leur utilité peut être limitée à moins que les cellules choisies aient été soumises à un traitement optimal avant la transplantation.

Dans un article publié en 2017, Ionna Sandvig a examiné les conditions de culture cellulaire *ex vivo* peuvent influencer la survie des CSN et CStroM après la transplantation, et l'importance du préconditionnement physiologique, qui tient compte du métabolisme des cellules souches ainsi que de celui du microenvironnement tissulaire, pour optimiser l'efficacité de la greffe (Sandvig et al., 2017). Ses études ont mis en évidence que le pré-conditionnement des CS avant implantation, à basse concentration en oxygène (<5% O₂) permettait une augmentation de la survie des cellules greffées dans le noyau ischémique ou la zone de pénombre/péri-infarctus.

OBJECTIFS

Les CStroM sont des cellules adhérentes fibroblastiques présentes dans de nombreux tissus et organes (moelle osseuse, tissu adipeux, gelée de Wharton, etc...). Ces cellules sont morphologiquement semblables mais très hétérogènes sur le plan fonctionnel car seule une petite fraction est formée de CSM, avec une forte capacité proliférative, capable de s'auto-renouveler et de se différencier en types cellulaires variés, telle est la définition des cellules souches.

Les cellules hématopoïétiques sont à l'origine de l'ensemble des cellules du tissu sanguin. Ces cellules possèdent une capacité de prolifération et de différenciation extrêmement importante. Leur caractérisation est plus avancée sur le plan phénotypique et on sélectionne des cellules qui sont les plus primitives à l'image des cellules CD34⁺.

Les données récentes montrent que les CS résident dans des niches très peu oxygénées où elles sont énergétiquement orientées vers la glycolyse anaérobie (Ito & Suda, 2014; Ivanovic, 2009). Ainsi, la culture des CS dans un environnement à faible concentration en O₂ améliore les caractéristiques fonctionnelles souches (capacité proliférative et clonogénique, d'auto-renouvellement à long terme, et de la multipotence) (Estrada et al., 2012; Pattappa et al., 2011). En plus de l'apport énergétique majeur de la glycolyse, les CSA possèdent également des mitochondries actives qui contribuent à leur maintien (Folmes et al., 2012). La présence des mitochondries fonctionnelles permet un passage rapide à l'OxPhos pour répondre aux fortes demandes énergétiques liées à la différenciation vers les cellules somatiques matures. Ces cellules semblent aussi posséder des mitochondries capables de fonctionner de manière anaérobie (Mylotte et al., 2008) tel qu'il a été montré dans les cellules cancéreuses (Tomitsuka et al., 2010). Ces souplesses énergétiques pourront permettre une grande flexibilité métabolique qui a été suggéré pour les CSH *in vitro* (Vlaski-Lafarge et al., 2020).

La capacité de survie des cellules primitives adultes (CS et progénitrices) en conditions extrêmes a déjà été évoquée (Vlaski-Lafarge et al., 2020). La similitude fonctionnelle des CS et des cellules souches cancéreuses capables de survivre les conditions extrêmes est bien établie.

Dans ce projet, nous voulons donc tester l'hypothèse que des CSM ou CSH, contrairement aux cellules plus matures, peuvent survivre dans les conditions extrêmes (anoxie et ischémie) grâce à des adaptations métaboliques notamment l'activation des mitochondries en mode anaérobie.

Nous allons donc, dans un premier temps, caractériser fonctionnellement les cellules, à savoir si elles sont capables de survivre dans ces conditions extrêmes et quelle est le type cellulaire responsable de cette survie. Une fois l'hypothèse confirmée, nous voudrions caractériser ces adaptations sur le plan

métabolique, biochimique et moléculaire. La dernière partie sera consacré à des études transcriptomiques, protéomiques et métaboliques pour déterminer les voies métaboliques impliqués dans la survie. Cela permettrait également de répondre à la question de savoir si les CSA possèdent la capacité de revenir vers une configuration fonctionnelle ancestrale existant chez les premiers eucaryotes (voir chapitre 2 ; [Ivanovic & Vlaski-Lafarge, 2016](#)).

Ceci pourrait fournir une approche pour une utilisation en thérapie et ingénierie cellulaire basée sur la flexibilité métabolique pour sélectionner des cellules multipotentes à forte capacité proliférative et métaboliquement adaptées pour repeupler et régénérer des tissus lésés.

MATERIELS ET METHODES

Les expériences sont réalisées sur deux populations de CS accessibles dans le laboratoire de l'EFS, une population de CStroM issue de la MO et une population de CSH issue d'USP.

Ces deux types cellulaires sont masquées au milieu de populations hétérogènes composée de rares CS et d'une majorité de progéniteurs.

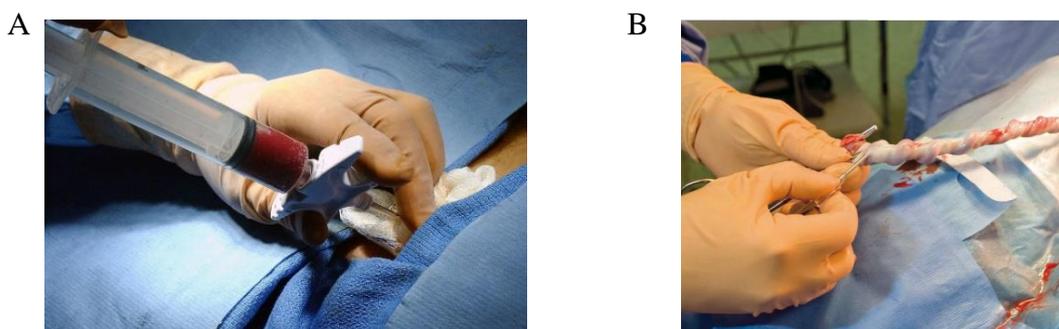


Figure 28. Image de prélèvement de cellules. A. Don de MO. Photo du seconde classe Chad McNeeley. B. Don de sang de cordon ombilicale. Photo de Jean-Bernard Nadeau pour l'EFS.

1. Culture cellulaire et préparation des cellules

1.1. Récupération et amplification des CStroM

Les CStroM sont isolées de la fraction cellulaire mononucléée de la MO (MO utilisée pour la préparation de greffes hématopoïétiques allogéniques) de donneurs humains sains. L'utilisation de ces cellules à des fins de recherche scientifique dans notre laboratoire a été autorisée par le Ministère National de l'Éducation Nationale et de la Recherche de la République Française conformément aux procédures réglementaires en vigueur (dossier N° : DC-2018-3143). Les CStroM sont sélectionnées à partir des à partir des filtres de déleucocytation de don de MO, par leur propriété à adhérer sur une surface plastique dans des conditions de culture standard (Dominici et al., 2006).

Après lyse des globules rouges par du chlorure d'ammonium (8.2 mg/ml ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis) et lavages, les cellules sont cultivées dans un milieu α -MEM (Minimum Essential Medium Alpha Modification) ; (Gibco, New-York, Etats-Unis) additionné avec du SVF 10 % v/v (GE Healthcare Life Science, Buc), 1 ng/ml de bFGF (Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France), 100 U/ml de Penicilline et 100 μ g/ml de streptomycine (PS ; Biological Industries, Haemek, Israël), dans des flacons T175. Les cellules sont incubées en atmosphère saturée d'eau, à 5% de CO₂, 21% d'O₂ et 37°C.

Lorsque les cellules atteignent 90% de confluence, elles sont récupérées après trypsinisation (trypsine-EDTA ; Lonza Bioscience, Colmar, France) et cryoconservées à -196°C pour les utilisations expérimentales, « passage 0 » (P0).

1.2. Récupération des cellules CD34⁺ d'unité de sang placentaire

Les échantillons sont prélevés, avec le consentement de la mère, dans des poches stériles contenant de l'anticoagulant et livrés à l'Unité de Thérapie Cellulaire de l'Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin, Site de Bordeaux. Seuls les échantillons non conformes pour la banque sont utilisés pour nos expériences.

Les cellules CD34⁺ sont isolées par une sélection immuno-magnétique (technologie Miltenyi Biotec, Paris, France). Ce protocole se passe en plusieurs étapes. En premier, la séparation des cellules mononuclées contenant des cellules CD34⁺ est obtenue par centrifugation (23 min, 930g, 20°C) sur un gradient de densité Ficoll (Eurobio Scientific, Les Ulis, France). L'anneau cellulaire à l'interface entre le ficoll et le plasma est récupéré et centrifugé à 1200g pendant 10 min. Le culot est lavé avec un tampon de sélection (PBS 4% d'albumine 2 mM EDTA) pendant 10 min à 430 g. Puis le culot cellulaire est resuspendu dans environ 1 ml de tampon de sélection et incubé pendant 20 min avec de la tégeline 50mg/ml pour saturer les sites non spécifiques (LFB, Evry, France). Ensuite, les cellules exprimant l'antigène CD34 sont marquées, sous agitation pendant 30 minutes à 4°C, avec l'anticorps anti-CD34 (Miltenyi Biotec, Paris, France) couplé à une bille magnétique, ce qui permet sous l'action d'un champ magnétique de récupérer une population de cellules CD34⁺ d'une pureté supérieure à 90 %. Les cellules sont ensuite cryoconservées à -196°C pour les utilisations expérimentales.

1.3. Culture des CStrom et CSH dans les conditions expérimentales d'Anoxie/Aglycémie (AA), Anoxie (Ano) et la condition contrôle à 3% d'O₂

Les CStrom de passage 0 et les CD34⁺ d'USP congelées sont cultivées dans différentes conditions. La première condition expérimentale est l'anoxie (0% d'O₂, Ano), et la deuxième condition est l'anoxie/aglycémie (AA ; 0% d'O₂ et sans glucose) qui mime l'ischémie. Ces deux conditions seront comparées à un contrôle à 3% d'O₂ qui représente la concentration d'O₂ moyenne dans la niche hématopoïétique.

1.3.1. Les milieux de culture

La composition des différents milieux utilisés sont décrits dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

CONDITION	CELLULES	MILIEU	SUPPLEMENTATION
AA	CStrom	<i>MILIEU A</i> α-MEM sans glucose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis)	SVF 10 % (GE Healthcare Life Science, Buc, France) bFGF 1 ng/ml (PeproTech, Neuilly-sur-Seine, France) PS 100 UI/ml Pénicilline 100 µg/ml Streptomycine (Biological Industries, Haemek, Israël) Ultraglutamine II 200 mM (Lonza, Bâle, Suisse)
	CD34 ⁺	<i>MILIEU B</i> Stemα MAF sans Glucose (Stem Alpha SA, St. Genis l'Argentière, France)	SCF 100ng/ml TPO 10 ng/ml (PeproTech, Neuilly-sur-Seine, France) IL-3 0,5 ng/ml (Pepro Tech, Neuilly-sur-Seine, France) PS 100 UI/ml Pénicilline 100 µg/ml Streptomycine (Biological Industries, Haemek, Israël)
ANO 3% d'O ₂	CStrom	<i>MILIEU C</i> α-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis)	SVF 10 % (GE Healthcare Life Science, Buc, France) bFGF 1 ng/ml (PeproTech, Neuilly-sur-Seine, France) PS 100 UI/ml Pénicilline 100 µg/ml Streptomycine (Biological industries, Haemek, Israël)
	CD34 ⁺	<i>MILIEU D</i> Stemα MAF sans Glucose (Stem Alpha SA, St. Genis l'Argentière, France)	SCF 100 ng/ml TPO 10 ng/ml (PeproTech, Neuilly-sur-Seine, France) IL-3 0,5 ng/ml (Pepro Tech, Neuilly-sur-Seine, France) Glucose 1g/l PS 100 UI/ml Pénicilline 100 µg/ml Streptomycine (Biological industries, Haemek, Israël)

Tableau 2. Composition des différents milieux utilisées pour les trois conditions expérimentales d'AA, d'ANO et de 3% d'O₂.

1.3.2. La mise en place des différentes conditions d'oxygénation

Pour la condition physiologique, les cellules sont incubées à 3 % d'O₂ dans une chambre de culture où les concentrations en O₂ et CO₂ sont contrôlées (PRO-OX et PRO-CO₂, Biospherix, New York, Etats-Unis).



Figure 29. Chambre d'anoxie.

L'anoxie est obtenue en plaçant les cellules dans une chambre d'incubateur modulaire (Figure 29) hermétiquement fermée (Billups-Rothenberg, San Diego, Etats-Unis) dans laquelle l'air ambiant a été remplacé par un mélange gazeux de 95 % d'azote et de 5 % de CO₂ (Air Liquide, Paris, France).

A la fin de la période d'incubation, la survie et l'expansion cellulaire sont estimées par comptage des cellules sur lame de Malassez après dilution en bleu trypan (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis).

2. Préparation des culots secs et des extraits protéiques

Environ 4.10⁶ cellules ont été préalablement préparés dans les trois conditions (AA, ANO et 3% d'O₂).

3.1. Culots secs

Pour les conditions AA, ANO les lavages et l'ajout des produits sont effectués dans l'enceinte d'un système Biospherix Xvivo (Biospherix, New York, Etats-Unis) à 1% d'O₂. Pour la condition à 3% d'O₂, les manipulations et les lavages se font dans l'enceinte du biosphérix à 3% d'O₂. Le PBS, la trypsine et l'albumine sont déoxygénés avant utilisation.

Les cellules sont lavées en PBS, décollées si besoin (trypsinisation des CStrom) et centrifugées à 430g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est retiré et les culots secs sont congelés à -80°C.

3.1. Extraits protéiques

Les cellules sont lavées en PBS et remises en suspension dans un tampon de lyse (Tris-HCL 20 mM, NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, TritonX100 1%, pyrophosphate de sodium 2,5 mM, β-glycérophosphate 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, 1 µg/mL de leupeptine (Cell Signaling Technology, Danvers, Etats-Unis). Après 5min d'incubation sur glace, les cellules sont soniquées pendant 5min. Après centrifugation à 14000g pendant 10 min à 4°C, les surnageants sont congelés à -80°C.

3. Analyses fonctionnelles

3.1. Analyse de la mort cellulaire, apoptose/nécrose

Ce test est réalisé par cytométrie en flux, en utilisant un kit de détection de l'apoptose à l'annexin V-FITC et IP (Iodure de Propidium) (Beckman Coulter, Villepinte, France). On peut distinguer les cellules viables (Annexin⁻ / IP⁻), les cellules apoptotiques précoces (Annexin⁺ / IP⁻) et les cellules en apoptose/nécrose tardive (Annexin⁺ / IP⁺).

Le tampon de liaison fourni dans le kit est un tampon optimisé pour l'imagerie et la cytométrie en flux. C'est un tampon isotonique conçu pour favoriser le marquage des cellules apoptotiques. Ce tampon a un pH de 7,4 et contient une concentration optimale de calcium qui facilite la liaison de l'annexin V aux résidus de phosphatidylsérine exposés à la surface des cellules apoptotiques. Le tampon est fourni à une concentration de 10X et est dilué au 1/10^e au début de l'expérience et gardé dans la glace.

Les cellules sont lavées en PBS froid (4°C), centrifugées à 450g à 4°C pendant 10 min, puis resuspendues dans le tampon 1X à une concentration de 1.10⁶ cellules/ml. Selon les recommandations du fabricant, 100µL de suspension cellulaire sont incubées avec 1µl d'annexin V-FITC et 5 µL d'IP, pendant 15min dans la glace et dans le noir. A la fin de l'incubation, les cellules sont lavées avec du PBS et resuspendues dans du tampon 1X avant la lecture au cytomètre BD FACSCanto II (Becton Dickinson, Grenoble, France).

3.2. Tests clonogéniques "Colony-forming cell" (CFC)

Les progéniteurs hématopoïétiques morphologiquement non identifiables sont mis en évidence par le test CFC. Il repose sur la capacité des progéniteurs existant dans la population cellulaire CD34⁺, à former des colonies dans un milieu semi-solide à base de méthylcellulose contenant des cytokines stimulant la croissance et la différenciation hématopoïétique. Ceci permet de déterminer la capacité clonogénique des cellules progéniteurs hématopoïétiques engagés (Figure 30).

Le milieu semi-solide est à base de méthylcellulose (Methocult H4034 ; Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) formulé pour favoriser la croissance optimale des cellules progénitrices érythroïdes (BFU-E et CFU-E), des cellules progénitrices granulocytes-macrophages (CFU-GM, CFU-G et CFU-M) et des cellules progénitrices multipotentiels (érythroïdes, macrophages, mégacaryocytes-CFU-GEMM). L'inclusion du G-CSF dans la formulation améliore la discrimination des sous-types de colonies myéloïdes.

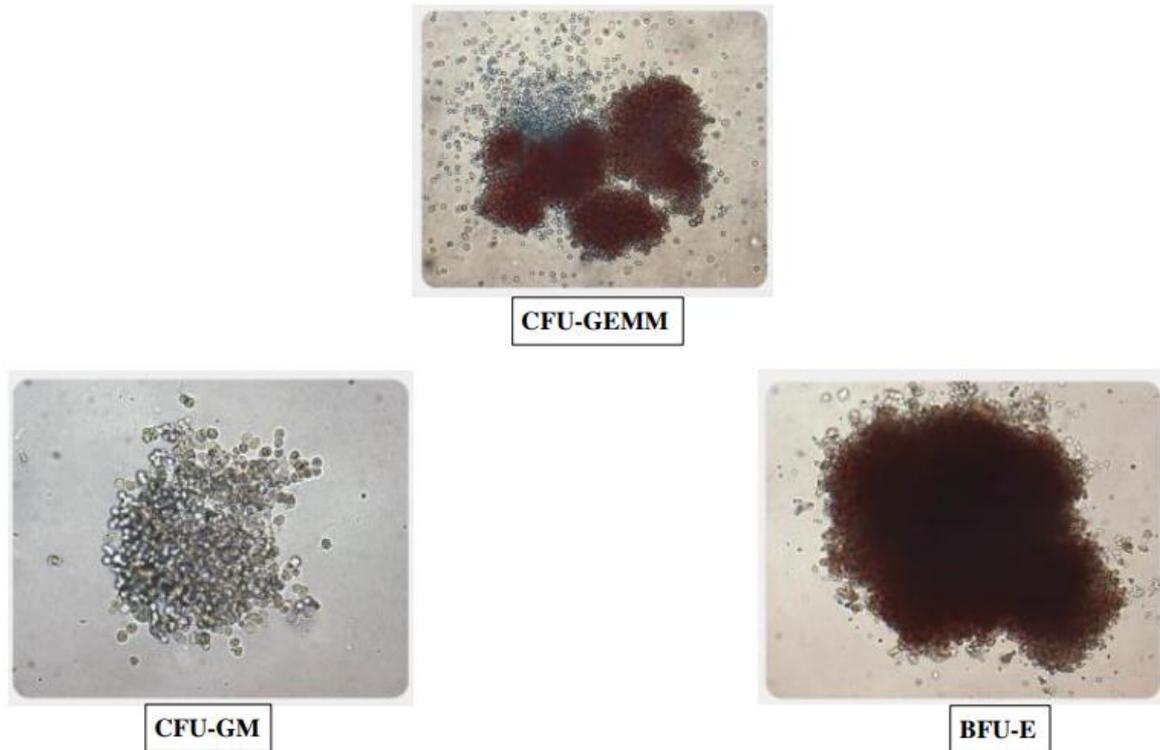


Figure 30. Colonies observées par le test de Colony Forming Cells (CFC). Les trois types de colonies sont observés après deux semaines dans la méthyl cellulose. Les colonies blanches sont les CFU-GM formant les granulocytes et les macrophages. Les colonies rouges sont les BFU-E et forment les érythrocytes et enfin la colonie mixte est appelée CFU-GEMM et a la capacité de former des granulocytes, des érythrocytes, des macrophages et des mégacaryocytes.

Les cellules $CD34^+$ sont ensemencées en doublon (deux puits par condition) dans des plaques à 24 puits (Corning, Albany, Etats-Unis), à une concentration de 75 cellules/250 μ l de methylcellulose (Ivanovic et al., 2004), et incubées pendant 14 jours à 37°C en atmosphère saturée d'eau, 20% O_2 et 5% CO_2 . Après 14 jours, l'identification et le dénombrement des érythrocytes (BFU-E), des granulocytes et des monocytes (CFU-GM) se fait à l'aide d'un microscope inversé (Nikon ECLIPSE Ti2-U, Nikon, Tokyo, Japon).

3.3. Co-culture de CStrom et des cellules $CD34^+$

Pour estimer l'influence des CStrom sur les fonctionnalités et le maintien des CSH, et l'impact du pré-conditionnement sur les CSH, les CStrom et les CSH sont co-cultivés pendant 10 jours.

Au préalable, les CStrom sont cultivés dans les trois conditions expérimentales (AA, ANO et 3% d' O_2). Après 4 jours de culture, le milieu est enlevé, et 2.10^4 $CD34^+$ décongelées sont ajoutés dans du milieu D supplémenté avec du SVF à 5 % (GE Healthcare Life Science, Buc, France). Les cultures sont incubées à 37°C, 3% O_2 et 5% de CO_2 .

Après 10 jours de co-culture, les cellules non adhérentes CD34⁺ sont soigneusement récoltées, lavées, et les cellules viables énumérées (test d'exclusion au bleu Trypan). Les cellules sont séparées en deux pools :

- C1 : descendance totale au jour 10 de 20 000 cellules CD34⁺ étalées au jour 0 dans des cultures de 1 ml

- C2 : réalisé avec 200 ml de suspension cellulaire C1

La production de progéniteurs engagés lors d'une culture secondaire à long terme (C2) reflète la présence et la quantité d'une population primitive située entre progéniteurs et cellules souches (pré-CFC) en C1 ([Hammoud et al., 2012](#); [Ivanovic et al., 2002](#); [Ivanović, Dello Sbarba, et al., 2000](#); [Kovačević-Filipović et al., 2007](#)).

Les cellules C1 sont utilisées pour réaliser un test CFC et les cellules C2 sont mises en culture dans 1mL de milieu D pour la détection des pré-CFC, réalisé durant 5 semaines. Le pool C2 est cultivé à 3% O₂ avec un demi-dépeuplement hebdomadaire et un ajout de milieu frais qui a été pris en compte pour la normalisation. Chaque semaine de C2, les cellules ont été étalées dans de la méthylcellulose pour détecter les progéniteurs engagés, comme mentionné ci-dessus.

3.4. Analyse du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire a été analysé avec de l'IP (Beckman Coulter, Villepinte, France) et un anticorps (Ac) anti-Ki-67 couplé à l'alexa-fluor (Becton Dickinson, Grenoble, France). La fixation nucléaire de l'IP est utilisée pour mesurer la teneur en ADN et l'expression de la protéine Ki-67 est un marqueur des phases actives du cycle cellulaire (G, S, et G2/M) ([Hermitte et al., 2006](#)).

Les cellules sont lavées et fixées dans un mélange PBS et formaldéhyde à 0,5% final pendant 2h. Après lavage, elles sont resuspendues dans de l'EtOH 80% à -20°C (éthanol absolu 80% et H₂O 20% préalablement congelé) pendant 2h supplémentaire. L'incubation de ces deux étapes peut aussi s'effectuer toute la nuit. Les cellules sont ensuite lavées et perméabilisées grâce à une solution de PBS, 0,5% de BSA et 0,25% de Triton X100 et colorées avec un isothiocyanate anti-Ki-67-fluorescéine ou avec le contrôle isotypique correspondant pendant 45 minutes à 4°C et à l'obscurité. Après avoir été lavées, les cellules ont été marquées pour l'IP dans une solution de PBS-Ribonucléase-IP (PBS-Ribonucléase 1mg/ML et IP 50µg/ML) et analysées par cytométrie en flux, BD FACSCanto II (Becton Dickinson, Grenoble, France).

3.5. Analyse « single-cell »

La méthode a été réalisée comme cela a été publié précédemment (Loncaric et al., 2019).

3.5.1. Capacité de prolifération (Figure 31A)

Les CStroM sontensemencées dans des puits individuels de plaques à 96 puits avec une seule cellule par puit dans le milieu A pour la condition AA et dans le milieu C pour les conditions ANO et 3% d'O₂ (voir Tableau 2). La présence d'une cellule par puit est vérifiée par microscopie inversée (Nikon ECLIPSE Ti2-U, Nikon, Tokyo, Japon) et les rares puits comprenant plus d'une cellule ont été exclus de l'analyse. La distribution dans les puits est effectuée par dilution à 0,5 cellules par puit. Les plaques ont été incubées dans les trois conditions expérimentales pendant 14 jours. Après la période d'incubation les puits sont évalués pour détecter la présence de colonies. Dans les puits où des colonies ont été formées, la totalité des cellules produites dans la culture primaire à partir d'une cellule individuelle est réensemencée dans un puits de plaques 6 puits dans les mêmes conditions de culture. Le contenu des cellules de culture secondaire est réévalué 14 jours plus tard. Les colonies sont observées et le pourcentage de puits positifs noté et analysé en fonction de la taille des colonies.

3.5.2. Capacité de différenciation/multipotence (Figure 31B)

Pour estimer le potentiel de différenciation d'un seul CStroM (provenant du même donneur) de chacune des conditions expérimentales (voir ci-dessus), les cellules sont incubées de la même manière que celle décrite pour l'analyse de la capacité de prolifération. Après 14 jours, les puits contenant une colonie issue d'une cellule sont trypsinisés et divisés en trois puits distincts, chacun fournissant les conditions d'une des trois voies de différenciation : ostéogénique, adipogène ou chondrogénique (respectivement kit StemPro Osteogenesis, kit StemPro Chondrogenesis, kit StemPro Adipogénèse ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis). A la fin des 14 jours de culture, les puits sont colorés selon les besoins des conditions de différenciation : Bleu Alcian (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) pour les chondrocytes, Oil-red (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) et Hématoxyline (Merck, Darmstadt, Allemagne) pour les adipocytes. Après 21 jours de culture, du rouge Alizarine S Alcian (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) est utilisé pour mettre en évidence la présence de ostéocytes.

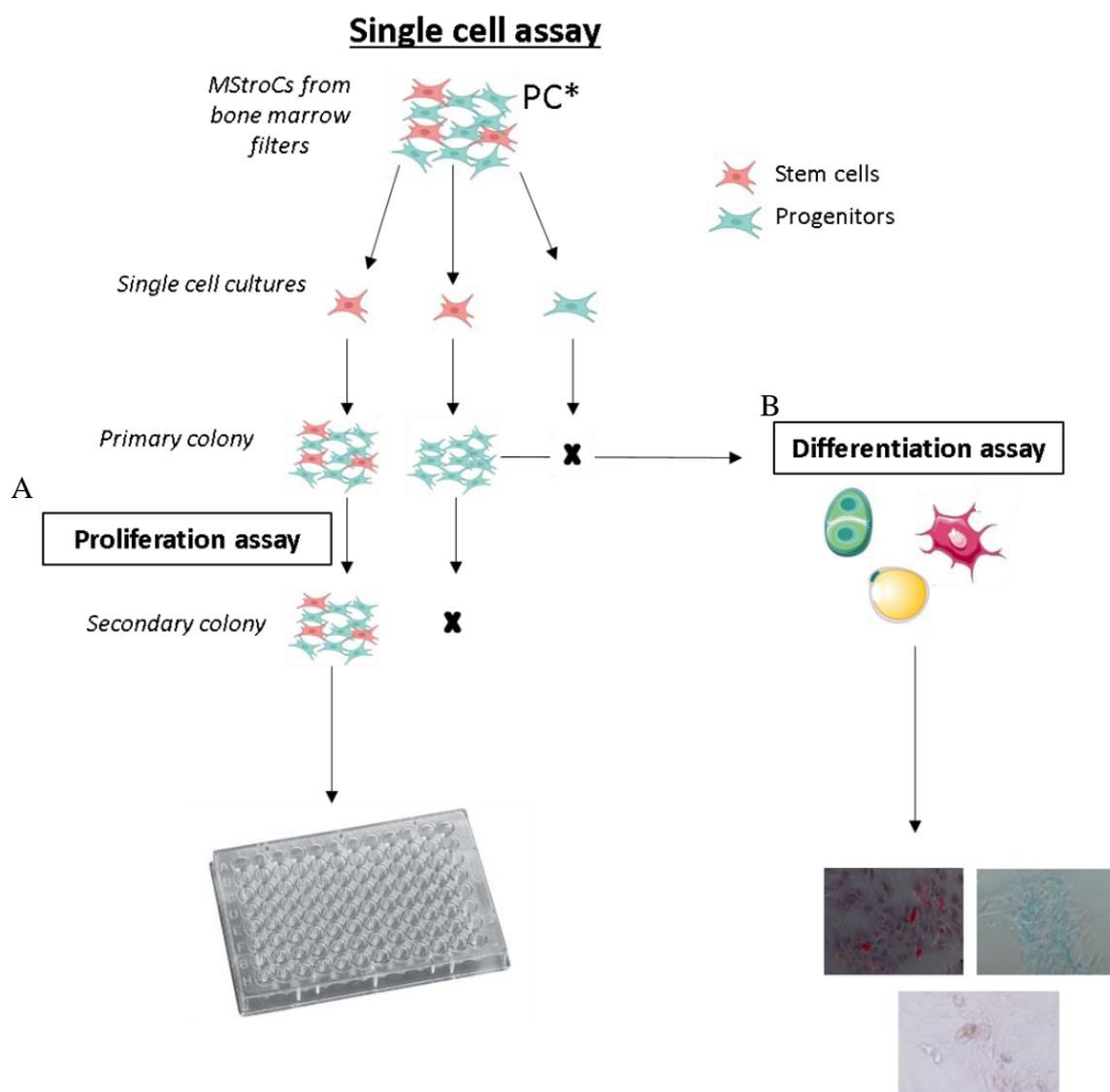


Figure 31. Représentation schématique du test d'évaluation de la capacité de prolifération et de différenciation d'une cellule individuelle.

4. Analyse des gènes de primitivité

Les gènes de primitivité ont été analysés par RT-PCR quantitative. L'extraction des ARNm est effectuée dans un système Biospherix Xvivo (Biospherix, New York, Etats-Unis) comme décrit dans la partie 1.4.

La lyse des cellules est effectuée, après un lavage des cellules au PBS, au TRIZOL froid (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis). Les lysats ont été collectés par grattage.

L'ARN total est ensuite récupéré. Pour 500 µl de TRIZOL, 100 µL de chloroforme : Isoamyl alcohol 24 :1 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis) est ajouté. Après centrifugation à 12000g pendant 15 min à 4°C, les ARN se retrouvent dans la phase supérieure aqueuse. La phase aqueuse est récupérée et 250 µl d'isopropanol et 0.25µl de glycogène sont ajoutés pour permettre la précipitation de l'ARN. Le produit d'extraction est lavé par ajout d'éthanol à 75%. Le culot d'ARN est repris dans de l'eau DEPC

et incubée 10min à 60°C (Cette eau est exempt de RNase). L'ARN total récupéré est quantifié et analysé pour sa qualité à l'aide du NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) puis stocké à -80 °C pour une utilisation ultérieure.

La réaction de transcription inverse a été réalisée à l'aide d'un kit RT Quantitec (Qiagen, Hilden, Allemagne) avec 1 µg d'ARN total purifié dans un volume réactionnel de 10 µL, conformément aux recommandations du fabricant. Avant de procéder, une étape d'élimination de l'ADN génomique résiduel est faite pour s'affranchir des contaminations. Les échantillons sont incubés 2 min à 42°C (T100 Thermal Cycler, BioRad, Hercules, Etats-Unis). Le kit combine deux enzymes nécessaires pour la RT : Omniscript et Sensiscript, qui permettent une grande sensibilité. Les amorces (Tableau 3) sont incluses dans le kit, ce sont des oligod(T) qui s'hybrident sur les queues poly(A) des ARNm ainsi que sur les « random primers » qui ciblent de nombreux sites. Elles permettent ainsi d'obtenir un bon rendement même au niveau des régions 5'. Pour un échantillon, 4µl de tampon Quantiscript RT Buffer (fournit dans le kit) sont ajoutés ainsi qu'1µl d'amorces et 1 µl de l'enzyme Quantiscript Reverse Transcriptase. Pour le contrôle, 8µl de tampon, 2µl d'amorces et 2µl d'eau sont ajoutés à l'échantillon. Les échantillons sont incubés 15 min à 42°C pour la réaction, puis 3 min à 95°C pour inactiver l'enzyme. Au terme de la RT, on obtient 1µg d'ADNc qui sont dilués à une concentration de 2ng/µl.

La PCR quantitative (qPCR) en temps réel, est réalisée grâce au kit PowerUp SYBR Green (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) avec l'enzyme Taq DNA polymerase. Le SYBR Green, un intercalant de l'ADN qui fluoresce quand il se fixe sur l'ADN double brin, est utilisé pour détecter les acides nucléiques. A chaque cycle, il va s'accumuler et la fluorescence mesurée sera proportionnelle à la quantité de produits PCR générés.

Les gènes cibles détectés ici sont *NOTCH1*, *C-MYC*, *NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*, *HIF1α* et *HIF2α* qui sont les gènes impliqués dans les voies de signalisation pour le maintien de la pluripotence et de la croissance cellulaire. Des gènes de références ont été utilisés (*ACTB*, *TUBA1A* et *HPRT*). Les amorces utilisées ont été conçues avec le logiciel PRIMER-blast et sont à la concentration de 10 µM.

Gènes d'intérêt	Amorces sens	Amorces anti-sens
<i>HIF1α</i>	TTCACCTGAGCCTAATAGTCC	CAAGTCTAAATCTGTGTCCTG
<i>HIF2α</i>	GCCCAATAGCCCTGAAGACT	TGAAATCCGTCTGGGTACTGC
<i>NOTCH1</i>	CGCACAAAGGTGTCTTCCAG	AGGATCAGTGGCGTCGTG
<i>C-MYC</i>	TACAACACCCGAGCAAGGAC	GAGGCTGCTGGTTTTCCACT
<i>SOX2</i>	ATGGGAGGGGTGCAAAGAG	GCTGTCATTTGCTGTGGGTG
<i>OCT3/4</i>	GAAGGATGTGGTCCGAGTGT	GAGACCAGCAGCCTCAAAA
<i>NANOG</i>	TTTGTGGGCTGAAGAAACT	AGGGCTGTCTGAATAAGCAG
<i>ACTB</i>	TGAGGTCAATGAAGGGGTC	GTGAAGGTCGGAGTCAACG
<i>TUBA1A</i>	ATTGGCAATGAGCGGTTT	GGATGCCACAGGACTCCAT
<i>HPRT</i>	CCCTGGCGTCGTGATTAGTG	TCGAGCAAGACGTTTCAGTCC

Tableau 3. Amorces utilisés pour la qPCR.

Une gamme de standards à partir d'une matrice exprimant le gène d'intérêt est réalisée pour quantifier l'expression du gène au sein des échantillons. Pour les gènes *C-MYC*, *SOX2* et *OCT3/4*, la matrice est composée de cellules iPS et pour les gènes *NANOG*, *HIF1α* et *HIF2α*, des CStroM.

Sur une plaque 384 puits (BioRad, Hercules, Etats-Unis), 5,5 µl de MasterMix, comprenant le tampon et l'enzyme (Dual-Lock Taq DNA Polymerase), sont disposés à la pipette automatique ainsi que 0,44 µl d'amorces spécifiques et 0,06 µl d'eau DEPC (Qiagen, Hilden, Allemagne). Les ADNc sont ajoutés à une quantité de 2ng ou de 10 ng selon l'expression du gène d'intérêt dans les CStroM. Des témoins de non-contamination et des témoins de RT sont déposés. La plaque est centrifugée à 1000g puis déposée dans le thermocycleur CFX384 Touch RealTime PCR Detection System (BioRad, Hercules, Etats-Unis).

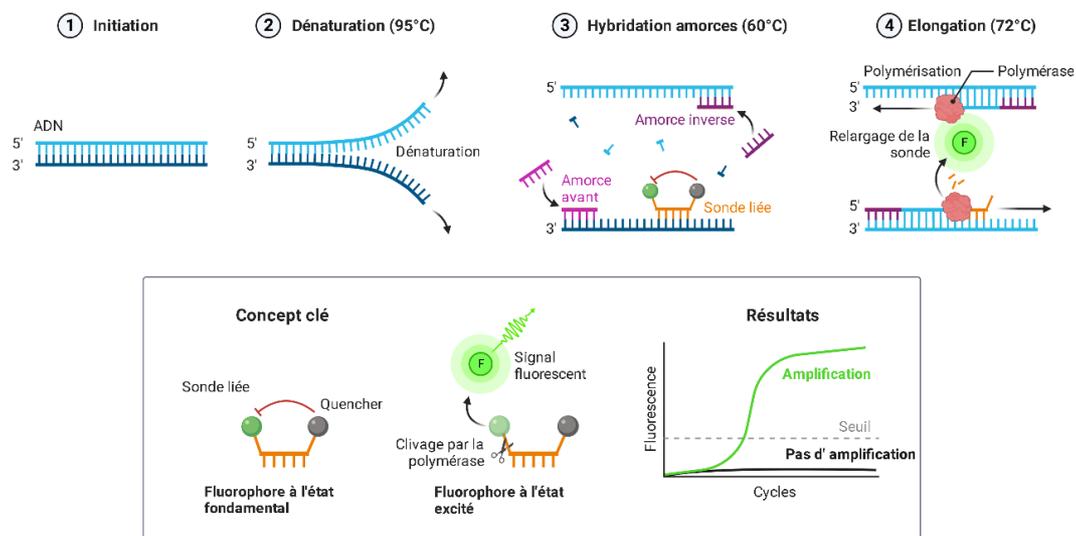


Figure 32. Schéma du déroulement de la qPCR.

5. Analyse du profil bioénergétique des CS

L'ensemble des tests biochimiques suivants est réalisé dans le respect des différentes conditions d'oxygénation en utilisant un système Biospherix Xvivo. Pour les conditions AA, ANO les incubations se font à 0,1% O₂ dans des enceintes présentes dans le biosphérix. Les lavages et l'ajout des produits sont effectués dans l'enceinte du Biospherix à 1% d'O₂. Pour la condition à 3% d'O₂ les manipulations et les lavages se font dans l'enceinte du Biosphérix à 3% d'O₂.

5.1. Masse mitochondriale

5.1.1. Détermination de la masse mitochondriale en utilisant le MitoTracker green

La masse mitochondriale est estimée avec l'aide du marqueur fluorescent MitoTracker green (MTG). Il est couramment utilisé pour la quantification des mitochondries par cytométrie en flux. Il s'accumule dans la mitochondrie en établissant des liaisons covalentes avec les groupements thiol des résidus cystéine des protéines mitochondriales indépendamment du potentiel de la membrane mitochondriale.

Les cellules des trois conditions de culture (AA, ANO et 3% d'O₂) sont préalablement incubées en présence du marqueur pendant 20 min à 37°C puis analysées par cytométrie en flux BD FACSCanto II (Becton Dickinson, Grenoble, France).

5.1.2. Détermination de la masse mitochondriale en utilisant le marqueur anti-TOM20

La quantité de mitochondrie peut aussi être évaluée en microscopie à fluorescence. Pour effectuer le marquage des mitochondries, on utilise un anticorps dirigé contre une protéine de la membrane mitochondriale : le TOM20. C'est une translocase très présente sur la membrane externe de la mitochondrie qui permet l'import de molécule (Ahting et al., 1999).

Les cellules seront préalablement incubées dans des plaques 24 puits (Ibidi, Gräfelfing, Allemagne) dans les conditions expérimentales (AA ; ANO et 3% O₂). Après 4 jours de culture, les cellules sont fixées avec du PFA à 4% pendant 15 min à température ambiante. Après fixation, les cellules sont perméabilisées par du Triton X100 à 0,3%, pendant 15 minutes à Température ambiante. La saturation se fait dans une solution de PBS, 0.1%HSA, 10% SVF, 0.2% Triton X100, 0.05% Tween20. Le marquage est fait avec un anticorps monoclonal de souris anti-TOM20 conjugué à l'Alexa fluor 488 pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, après un rinçage au PBS pendant 3x5 min, les noyaux sont marqués avec du

dapi (1 :1000) pendant 5 minutes à Tamb avant d'être lu avec un microscope confocal (Leica M210f, Leica Micro-system Ltd, Heerbrugg, Suisse) à un grossissement de 63. Les photos ont été prises avec les mêmes réglages. La barre d'échelle est de 5 μm .

5.2. Activité mitochondriale

Le potentiel membranaire, qui reflète l'activité mitochondriale, est évalué à l'aide d'un cytomètre en flux BD FACSCanto II (Becton Dickinson, Grenoble, France). Le potentiel mitochondrial en tant qu'indicateur de l'activité mitochondriale a été estimé avec l'ester méthylique de tétraméthylrhodamine (TMRM).

Les cellules sont incubées en présence du marqueur TMRM pendant 30 min à 37°C puis analysées par cytométrie en flux. Afin de s'affranchir du signal de fluorescence non spécifique du TMRM, les cellules sont traitées avec du 2,4-DNP 100 μM (10 minutes à 37°C dans l'obscurité), rincées puis soumises à une seconde lecture. La différence entre le MFI obtenu avant et après traitement au 2,4-DNP correspond au signal spécifique de l'activité mitochondriale.

5.3. Contenu en ATP

Les cellules ont étéensemencées avec $3 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^4$ et $1 \cdot 10^4$ par puits dans une plaque de 24 puits pour des conditions AA, ANO et 3 % d'O₂ respectivement, dans les milieux de culture spécifiques aux conditions et aux types cellulaires pendant 4 jours. Après 4 jours, les cellules ont été lysées et traitées pour le test avec le kit « CellTiter-GloR 2.0 » (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) qui permet de déterminer le nombre de cellules viables en quantifiant l'ATP (qui indique la présence de cellules métaboliquement actives). Ce test implique l'ajout d'un seul réactif directement sur les cellules en culture. Après l'incubation de 10 min à Tamb dans le noir, la mesure est faite à l'aide d'un luminomètre Glomax (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). La quantité d'ATP est calculé à partir des mesures RLU (« Relative light Unit ») à partir des courbes étalons (différentes concentrations d'ATP).

La mesure de la quantité d'ATP a été effectuée après l'ajout ou non d'inhibiteur d'enzyme du métabolisme cellulaire. Les inhibiteurs et leurs actions sont listés dans le tableau 4.

Enzyme ou voie métabolique	Inhibiteur
Glycolyse	2DG
Gluconéogenèse (<i>PEPCK</i>)	3MP
Complexe I (<i>NADH quinone reductase</i>)	Roténone Pirvinium pamoat (PP)
Complexe II (<i>Succinate dehydrogenase</i>)	Malonate
Liaison entre CII et UQ	Thenoyltrifluoroacetone (TTFA)
Complexe III (<i>Coenzyme Q-cytochrome c réductase</i>)	Antimycine
ATP synthase	Oligomycine
Hydrolyse de l'ATP	Azide

Tableau 4. Inhibiteurs métaboliques utilisés.

5.4. NADH/NAD ratio

Le rapport NAD^+/NADH a été quantifié en utilisant le kit NAD^+/NADH Glo Assay (Promega).

Les CStroM sont incubées dans les trois conditions (AA, ANO et 3% O_2) pendant 4 jours.

Après 4 jours, le milieu est retiré et les cellules sont recouvertes de 50 μl de PBS puis lysées avec l'ajout de 50 μl de tampon de lyse (0.2N NaOH 1% DTAB). Le lysat est réparti en 2 puits dans une plaque de 96 puits blanche (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis), l'un pour mesurer le NAD^+ et l'autre pour mesurer le NADH. 25 μl de HCL 0.4N sont ajoutés uniquement dans les puits destinés au dosage NAD^+ . Puis la plaque est chauffée à 60 °C pendant 15 min. Après équilibration de la plaque à température ambiante, les solutions sont neutralisées avec du Trizma base pour NAD^+ et avec du HCL-Trizma pour NADH. Un volume égal de réactif de détection NAD/NADH -Glo est ajouté à chaque puits, et après incubation à température ambiante pendant 60 min la luminescence est lue sur un luminomètre Glomax (Promega, Charbonnières-les-Bains, France).

5.5. Contenu en lactate

La quantité de lactate extracellulaire a été quantifiée à l'aide du kit Lactate-Glo Assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, France).

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 96 puits de manière à obtenir $5 \cdot 10^4$ à $1 \cdot 10^5$ cellules au moment de la mesure. Les cellules sont mises en culture dans les différentes conditions expérimentales (AA, ANO et 3% O_2) pendant 4 jours.

Pour déterminer le lactate extracellulaire de chaque échantillon testé, le surnageant de culture est filtré sur des filtres Amicon 10KDa (Amicon Ultra 2ml Centrifugal Filter Devices 10K ; Merck, Darmstadt, Allemagne) pour éliminer la lactate deshydrogénase pendant 15 minutes à 4000g 4°C. Les surnageants filtrés sont congelés à -80°C jusqu'au titrage.

Lors du titrage, les surnageants sont dilués dans du PBS froid au 1/50. Dans une plaque de 96 puits blanche on distribue 50µl de surnageant dilué, ainsi que d'une gamme de lactate, suivi de 50µl de Lactate Detection Reagent. Après une incubation d'1h à Tamb la luminescence est mesurée sur un luminomètre Glomax (Promega, Charbonnières-les-Bains, France).

La quantité de lactate est calculée à partir des mesures RLU (« Relative light Unit ») à partir des courbes étalons (différentes concentrations de lactate).

5.6. Mesure de l'activité métabolique

5.6.1. Analyse de la respiration cellulaire par la technologie OROBOROS

Le taux de consommation d'oxygène (TCO) basal a été mesuré par respirométrie à haute résolution (HRR) en utilisant l'Oxygraphe-2k (O2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Autriche). Elle permet de mesurer la quantité d'oxygène consommée par la mitochondrie en présence de divers substrats et inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cet appareil est composé d'une cuve réactionnelle thermostatée, hermétique, disposant d'une agitation magnétique et d'une électrode de type « Clark » (sensible à l'oxygène) composée d'une cathode en platine polarisée à 0,7 volts et d'une anode en argent, mises en contact par un électrolyte KCl à 3 M. Cet ensemble est isolé du milieu d'incubation par une membrane en téflon (Oroboros Instruments, Innsbruck, Autriche) imperméable à l'eau mais perméable à l'oxygène dissout dans le milieu de mesure. La réduction de l'oxygène au niveau de la cathode induit une modification de courant qui est directement proportionnelle à la concentration d'oxygène dissoute dans le milieu d'incubation. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel DatLab 7 (Oroboros Instrument, Innsbruck, Autriche). Les courbes obtenues représentent la diminution de la concentration d'oxygène dans la cuve réactionnelle au cours du temps.

Les mesures sont faites sur cellules entières. Les CStroM ont été incubés dans les trois conditions (AA, ANO et 3% O₂) pendant 4 jours. Après traitement, les cellules ont été lavées avec du PBS, détachées avec de la trypsine-EDTA et collectées par centrifugation. Chaque culot a été homogénéisé dans du milieu de culture sans SVF (pour éviter l'apport d'acides gras et le fonctionnement de la β-oxydation). Elle s'effectue sans ajout de substrats, les mitochondries utilisant les substrats cellulaires endogènes et ceux contenus dans le milieu de culture pour respirer. Les cellules resuspendues ont été ajoutées aux 1,5 mL de milieu α-MEM sans SVF déjà présents dans la cuve de mesure. Dès l'obtention d'une pente régulière, la consommation d'oxygène à l'état de routine a été mesurée. La phosphorylation

oxydative a ensuite été inhibée par l'ajout d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase – 5,25 µg/mL final), la pente obtenue correspond à l'état de gaspillage énergétique. Puis des ajouts successifs de 2 µL de FCCP (80 µM) ont été effectués jusqu'à obtenir une pente maximale. Enfin 2 mM d'antimycine A ont été ajoutés pour déterminer la consommation d'oxygène non mitochondriale.

Lors de cette mesure différents états respiratoires sont mesurés :

- L'état de routine ou état basal : consommation d'oxygène nécessaire à la synthèse d'ATP mitochondriale (fonctionnement normale de la CRM) via l'utilisation des substrats endogènes ou présents dans le milieu de culture par les cellules.
- L'état non phosphorylant ou gaspillage énergétique : consommation d'oxygène en condition non phosphorylante obtenue après ajout d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase). Il correspond à la quantité d'oxygène consommée par la mitochondrie mais non utilisée pour la synthèse d'ATP.
- L'état découplé ou état FCCP : consommation d'oxygène obtenue après ajout de FCCP (molécule protonophore entraînant une dissipation de la force proton motrice). Cet état correspond à la consommation d'oxygène liée à l'activité maximale de la chaîne respiratoire mitochondriale (non limitée par l'ATP synthase).
- L'état résiduel : consommation d'oxygène résiduelle obtenue après ajout d'antimycine A (inhibiteur du complexe III). Cet état représente la part d'oxygène non utilisé par la mitochondrie et est soustrait aux autres consommations d'oxygène obtenues préalablement.

A la fin, les différentes mesures nous permettent d'obtenir la constante de Michaelis (K_m) qui correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est à la moitié de la vitesse initiale maximale.

5.6.2. Analyse bioénergétique par la technologie Seahorse

Nous avons utilisé l'analyseur XF24 (SeaHorse Bioscience, Lexington, Etats-Unis) afin d'estimer simultanément le taux de consommation d'oxygène (OCR), une mesure de la respiration cellulaire, et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR) comme indicateur principalement de la production de lactate et de bicarbonate, qui ont été déterminés simultanément (Pike Winer & Wu, 2014; Vlaski-Lafarge et al., 2019; M. Wu et al., 2007). Les MStroC ont été cultivés en AA, ANO et 3% d'O₂ dans des plaques XF V7 de 24 puits à la densité cellulaire qui a été définie afin d'obtenir 5x10⁴ cellules/puits

après 4 jours de culture en milieu de croissance pour chaque condition expérimentale (Milieu A pour AA et milieu C pour ANO et 3% d'O₂). Au moment de l'évaluation, le milieu de croissance a été remplacé par le milieu de test approprié (voir ci-dessous) et les plaques ont été placées dans un incubateur sans CO₂ à 37 °C pendant 30 minutes pendant la calibration de la cartouche du capteur. Dans une expérience typique, trois mesures de base ont été enregistrées avant l'ajout d'un composé et trois mesures de réponse ont été prises après l'ajout de chaque composé. L'OCR et l'ECAR ont été signalés comme une moyenne minimale de trois taux absolus (pmoles/minute pour l'OCR et mpH/minute pour l'ECAR) ou d'un pourcentage du niveau de base, en utilisant la troisième mesure du niveau basal comme référence. Tous les modulateurs utilisés pour les mesures Seahorse ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint Louis, Etats-Unis)

a. Respiration mitochondriale

Les paramètres de la respiration mitochondriale ont été évalués dans le milieu de test constitué de DMEM (SeaHorse Bioscience, Lexington, Etats-Unis) sans bicarbonate complété par 25 mM de glucose, 1 mM de pyruvate et 2 mM de glutamine. La respiration mitochondriale a été suivie à l'état basal (mesures 1 à 3) et après injections séquentielles des modulateurs mitochondriaux oligomycine (1 µM ; mesures 4 à 6), 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNP ; 100 µM ; mesures 7 à 9), et antimycine/roténone (ant/rot ; 1 µM ; mesures 10 à 12) (M. Wu et al., 2007). Ce test permet d'estimer la respiration basale cellulaire (moyenne des valeurs OCR, mesures 1 à 3), la part de la respiration associée à la production d'adénosine triphosphate (ATP) issue d' OxPhos, la respiration couplée (moyenne OCR basale moins valeurs moyennes OCR après injection d'oligomycine mesures 4 à 6, respiration résistante à l'oligomycine), la part de la respiration associée à une fuite de protons (respiration résistante à l'oligomycine moins valeurs moyennes d'OCR après injection de ant/rot, mesures 10 à 12), la respiration maximale (valeurs moyennes d'OCR après DNP injection, mesures 7 à 9), la capacité disponible (respiration maximale moins respiration basale), la respiration non mitochondriale (RMN ; valeurs moyennes d'OCR après injection de ant/rot (mesures 10 à 12)) et la respiration mitochondriale (respiration basocellulaire moins RMN) (Pike Winer & Wu, 2014; M. Wu et al., 2007).

Quantification du taux de glutathion réduit et oxydé

5.7.1. Analyse de la quantité de glutathion de CstroM issus de culture en AA, ANO et à 3% d'O₂

Les cellules ont étéensemencées avec 3.10⁴, 2.10⁴ et 1.10⁴ par puits dans une plaque de 24 puits pour des conditions AA, ANO et 3 % d'O₂ respectivement, dans les milieux de culture spécifiques aux

conditions et aux types cellulaires (A et C) pendant 4 jours. Après 4 jours, les cellules ont été lysées et traitées pour le test dans une plaque 96 puits. Le rapport de glutathion réduit et oxydé a été mesuré à l'aide du kit de test luminescent GSH / GSSG-Glo (Promega, Madison, Etats-Unis) conformément au protocole du fabricant. Après l'incubation avec l'agent de détection, les 100 μ L de suspension ont été prélevés dans le puits et placés dans une plaque à 96 puits blanche opaque pour la mesure à l'aide d'un luminomètre Glomax (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Les ratios GSH/GSSG sont calculés à partir des mesures RLU (« Relative light Unit ») à partir des courbes étalons (différentes concentrations de glutathion).

5.7.2. Analyse de la quantité de glutathion de cellules CD34⁺ issus de culture en AA, ANO et à 3% d'O₂

Les cellules ont étéensemencées avec $XX.10^4$, 2.10^4 et 1.10^4 par puits dans une plaque de 96 puits pour des conditions AA, ANO et 3 % d'O₂ respectivement, dans les milieux de culture spécifiques aux conditions et aux types cellulaires pendant 7 jours (B et D). Après 7 jours, les cellules ont été traitées pour le test directement dans la plaque de culture. Le rapport de glutathion réduit et oxydé a été mesuré à l'aide du kit de test luminescent GSH / GSSG-Glo (Promega, Madison, Etats-Unis) conformément au protocole du fabricant. Après l'incubation avec l'agent de détection, les 100 μ L de suspension ont été prélevés dans le puits et placés dans une plaque à 96 puits blanche opaque pour la mesure à l'aide d'un luminomètre Glomax (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Les ratios GSH/GSSG sont calculés à partir des mesures RLU (« Relative light Unit ») à partir des courbes étalons (différentes concentrations de glutathion).

6. Analyse du profil métabolique des CS

6.1. Analyses transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques

Les extractions d'ARN totaux et les culots cellulaires conservés à -80°C (1.4. Matériels et Méthodes) ont été envoyés dans différentes plateformes d'analyse pour l'établissement du transcriptome, protéome et métabolome. L'arrêt de l'activité métabolique a été fait en utilisant le froid.

6.1.1. Analyse du transcriptome

L'analyse transcriptomique a été réalisée à GénoToul à Toulouse à l'aide d'un système de biopuce à ADN. Les ARNm ont été extraits de la même manière que pour la technique RT-PCRq (voir 2.6). L'hybridation se fait à l'aide d'un FOUR Agilent. Les biopuces permettent de mesurer des différences d'expression génétique. Les résultats nous ont été envoyé sous forme de tableau excel et présentant

les gènes différentiellement exprimé entre les différentes conditions : AA vs ANO, AA vs 3% d'O₂ et ANO vs 3% d'O₂.

6.1.2. Analyse du protéome

L'analyse protéomique a été réalisée à la plateforme génomique de Bordeaux. Les échantillons cellulaires ont été analysés après extraction protéiques et sont analysées par spectrométrie de masse sur un appareil haute résolution orbitrap Exploris 480 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) pour les identifier et les quantifier. Les spectres ont été acquis et analysé par bio-informatique et une analyse statistiques ainsi que les données brut nous ont été envoyé.

6.1.3. Analyse du métabolome

L'analyse métabolomique a été réalisée à MétaToul à Toulouse à l'aide d'un système Ultimate 3000 RSLC Nano-UPHLC (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) couplé à un spectromètre de masse tribrid Lumos Orbitrap Fusion Nanospray (ThermoFisher Scientific, Waltham, Etats-Unis). Les résultats nous ont été envoyé sous forme de tableau excel présentant les concentrations en µM pour 80 métabolites et XX acides aminés, dans les trois conditions expérimentales.

6.2. Analyse du Contenu en succinate

Le succinate accumulé au cours de la culture cellulaire a été détecté dans le surnageant de culture à la fin de la période d'incubation (kit de test Succinate, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni). Les suspensions cellulaires ont été récoltées, centrifugées. Les culots, remis en suspension dans 300 µl de tampon de dosage du succinate à 4°C et les surnageants collectés, ont été filtrés à l'aide d'un filtre Amicon de 10 kDa (Merck, Darmstadt, Allemagne). Ensuite, 50µl de chaque échantillon ou dilution standard ont été mélangés avec le même volume du mélange réactionnel ou du mélange témoin et incubés pendant 30 minutes à 37°C. L'intensité de l'absorbance a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Evolis, Biorad, Hercules, Etats-Unis). La concentration de succinate a ensuite été déterminée sur la base d'une courbe standard.

6.3. Analyses du contenu en H₂S

6.3.1. Contenu cellulaire en H₂S

Les cellules ont été incubées dans des conditions physiologiques pour le pour l'anoxie ou AA pendant 4 jours à 37 ° C dans une plaque à 24 puits (Ibidi, Gräfelting, Allemagne) pour atteindre 4.10⁴ cellules par puits pour chaque condition. Après 4 jours de culture, la quantité de surnageant est mesurée et ajustée à 1ml (le reste est transféré dans un eppendorf pour le témoin négatif). Dans les 1 ml de milieu restant, 0.5 µl de sonde MeRho-Az 10 mM est ajouté dans les puits et incubé à 37°C pendant 1h dans les conditions d'O₂ initiales et à l'obscurité. Après lavage au PBS, les cellules sont fixées avec 4% de paraformaldéhyde. Après 3 lavages en PBS froid, les images de chaque puit ont été acquises avec un microscope confocal Leica M210f (Leica Micro-system Ltd, Heerbrugg, Suisse).

6.3.2. Contenu en H₂S de la culture

La présence de sulfure rejeté dans le milieu extracellulaire est détectée à l'aide d'un papier de détection de H₂S en acétate de plomb (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) placé au-dessus de la phase liquide dans le bouchon du flacon T75. Les cellules ont été incubées pendant 4 à 5 jours à 37 ° C dans les trois conditions (AA, ANO et 3 % d'O₂) jusqu'à ce que le papier s'assombrisse au sulfure de plomb (Hine et al., 2015).

6.4. Analyse de la quantité de protéine

Pour une charge égale, la concentration en protéines du surnageant des cellules lysées a été déterminée avec un kit de dosage (Pierce™, kit de test de protéines BSA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis). Les échantillons ont été traités à 95 °C pendant 5 min et chargés sur des gels protéiques Mini-Protean TGX (BioRad, Hercules, Etats-Unis) dans un tampon d'électrophorèse (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, BioRad, Hercules, Etats-Unis) et les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose (BioRad, Hercules, Etats-Unis) dans un tampon de transfert (3% Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane, 9% Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane acétate, 1% Disodium ethylenediaminetetraacetate déhydrate, <1% Sodium dodecyl sulfate, FLASHBlot™ Transfer buffers, Advansta Inc., San Jose, Etats-unis). L'analyse par Western blot a été réalisée dans des conditions standard avec des Ac dirigés contre l'enzyme SQR (1:5000; Abcam, Cambridge, Angleterre). Des anticorps secondaires de chèvre anti-IgG de souris/lapin conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) (1/20000; Diagnostics, Blagnac, France) ont été utilisés pour détecter les protéines par chimioluminescence améliorée (BioRad, Hercules, Etats-Unis). Pour le contrôle de chargement (Ac anti-HSP90, 1 :1000, Abcam, Cambridge, Angleterre), la membrane a été coupée si la taille de la tubuline et de la protéine d'intérêt ne se chevauchaient pas, la membrane a été incubée avec le contrôle de chargement après détection de la protéine d'intérêt sur le même transfert. La détection

des protéines a été réalisée à l'aide du kit de substrat WesternBright HRP (Advansta, San Jose, Etats-unis) sur un système d'imagerie Fusion Solo S6 Edge.

6.5. Analyses de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale

Après avoir estimé la concentration en protéines des échantillons, l'activité du CI de la CRM est détectée à l'aide du kit de test colorimétrique d'activité du complexe mitochondrial I (Abcam, Cambridge, Angleterre). Les extraits protéiques sont incubés dans la plaque du kit durant 3h à T°amb sur un agitateur de plaque. De la même manière qu'une expérience Elisa, des Ac spécifiques du CI de la CRM qui va venir capturer les CI libres dans l'extrait protéiques. Après lavage des plaques avec les CI accrochés au fond des puits, l'activité du CI est déterminée en suivant l'oxydation du NADH (ajouté dans les puits) en NAD⁺ et la réduction simultanée d'un colorant qui conduit à une absorbance accrue à 450 nm.

6.6. Analyses de la consommation de substrats énergétiques par la technologie Omnilog

L'utilisation dans les cultures de substrat spécifique en fonction du temps a été mesuré par un lecteur colorimétrique Omnilog (Biolog Inc., Hayward, Etats-Unis). Le marqueur colorimétrique est généré lorsque le tétrazolium réagit avec le NADH produit lors de la production énergétique.

Deux types de test ont été effectués en utilisant deux plaques différentes, la « mitoplate » (S1) et la « Phenotype Microarrays 1 » (PM-M1). Ces plaques sont des plaques 96 puits pré-coatées avec différents métabolites. Les différents types de métabolites sont représentés dans les figures suivantes.

A1 No Substrate	A2 α-D-Glucose	A3 Glycogen	A4 D-Glucose-1-PO4	A5 No Substrate	A6 α-D-Glucose	A7 Glycogen	A8 D-Glucose-1-PO4	A9 No Substrate	A10 α-D-Glucose	A11 Glycogen	A12 D-Glucose-1-PO4
B1 D-Glucose-6-PO4	B2 D-Glucose-6-PO4	B3 D,L-α-Glycerol-PO4	B4 L-Lactic Acid	B5 D-Glucose-6-PO4	B6 D-Glucose-6-PO4	B7 D,L-α-Glycerol-PO4	B8 L-Lactic Acid	B9 D-Glucose-6-PO4	B10 D-Glucose-6-PO4	B11 D,L-α-Glycerol-PO4	B12 L-Lactic Acid
C1 Pyruvic Acid	C2 Citric Acid	C3 D,L-Isocitric Acid	C4 cis-Aconitic Acid	C5 Pyruvic Acid	C6 Citric Acid	C7 D,L-Isocitric Acid	C8 cis-Aconitic Acid	C9 Pyruvic Acid	C10 Citric Acid	C11 D,L-Isocitric Acid	C12 cis-Aconitic Acid
D1 α-Keto-Glutaric Acid	D2 Succinic Acid	D3 Fumaric Acid	D4 L-Malic Acid	D5 α-Keto-Glutaric Acid	D6 Succinic Acid	D7 Fumaric Acid	D8 L-Malic Acid	D9 α-Keto-Glutaric Acid	D10 Succinic Acid	D11 Fumaric Acid	D12 L-Malic Acid
E1 α-Keto-Butyric Acid	E2 D,L-β-Hydroxy-Butyric Acid	E3 L-Glutamic Acid	E4 L-Glutamine	E5 α-Keto-Butyric Acid	E6 D,L-β-Hydroxy-Butyric Acid	E7 L-Glutamic Acid	E8 L-Glutamine	E9 α-Keto-Butyric Acid	E10 D,L-β-Hydroxy-Butyric Acid	E11 L-Glutamic Acid	E12 L-Glutamine
F1 Ala-Gln	F2 L-Serine	F3 L-Ornithine	F4 Tryptamine	F5 Ala-Gln	F6 L-Serine	F7 L-Ornithine	F8 Tryptamine	F9 Ala-Gln	F10 L-Serine	F11 L-Ornithine	F12 Tryptamine
G1 L-Malic Acid 100μM	G2 Acetyl-L-Carnitine + L-Malic Acid 100μM	G3 Octanoyl-L-Carnitine + L-Malic Acid 100μM	G4 Palmitoyl-DL-Carnitine + L-Malic Acid 100μM	G5 L-Malic Acid 100μM	G6 Acetyl-L-Carnitine + L-Malic Acid 100μM	G7 Octanoyl-L-Carnitine + L-Malic Acid 100μM	G8 Palmitoyl-DL-Carnitine + L-Malic Acid 100μM	G9 L-Malic Acid 100μM	G10 Acetyl-L-Carnitine + L-Malic Acid 100μM	G11 Octanoyl-L-Carnitine + L-Malic Acid 100μM	G12 Palmitoyl-DL-Carnitine + L-Malic Acid 100μM
H1 Pyruvic Acid + L-Malic Acid 100μM	H2 γ-Amino-Butyric Acid + L-Malic Acid 100μM	H3 α-Keto-Isocaproic Acid + L-Malic Acid 100μM	H4 L-Leucine + L-Malic Acid 100μM	H5 Pyruvic Acid + L-Malic Acid 100μM	H6 γ-Amino-Butyric Acid + L-Malic Acid 100μM	H7 α-Keto-Isocaproic Acid + L-Malic Acid 100μM	H8 L-Leucine + L-Malic Acid 100μM	H9 Pyruvic Acid + L-Malic Acid 100μM	H10 γ-Amino-Butyric Acid + L-Malic Acid 100μM	H11 α-Keto-Isocaproic Acid + L-Malic Acid 100μM	H12 L-Leucine + L-Malic Acid 100μM

Figure 33. Plan de la plaque Mitoplate (S1).

A1 Negative Control	A2 Negative Control	A3 Negative Control	A4 α-Cyclodextrin	A5 Dextrin	A6 Glycogen	A7 Maltitol	A8 Maltotriose	A9 D-Maltose	A10 D-Trehalose	A11 D-Cellobiose	A12 β-Gentobiose
B1 D-Glucose-6-Phosphate	B2 α-D-Glucose-1-Phosphate	B3 L-Glucose	B4 α-D-Glucose	B5 α-D-Glucose	B6 α-D-Glucose	B7 3-O-Methyl-D-Glucose	B8 α-Methyl-D-Glucoside	B9 β-Methyl-D-Glucoside	B10 D-Salicin	B11 D-Sorbitol	B12 N-Acetyl-D-Glucosamine
C1 D-Glucosaminic Acid	C2 D-Glucuronic Acid	C3 Chondroitin-6-Sulfate	C4 Mannan	C5 D-Mannose	C6 α-Methyl-D-Mannoside	C7 D-Mannitol	C8 N-Acetyl-β-D-Mannosamine	C9 D-Melezitose	C10 Sucrose	C11 Palatinose	C12 D-Turanose
D1 D-Tagatose	D2 L-Sorbose	D3 L-Rhamnose	D4 L-Fucose	D5 D-Fucose	D6 D-Fructose-6-Phosphate	D7 D-Fructose	D8 Stachyose	D9 D-Raffinose	D10 D-Lactitol	D11 Lactulose	D12 α-D-Lactose
E1 Melibionnic Acid	E2 D-Melibiose	E3 D-Galactose	E4 α-Methyl-D-Galactoside	E5 β-Methyl-D-Galactoside	E6 N-Acetyl-Neuraminic Acid	E7 Pectin	E8 Sedoheptulosan	E9 Thymidine	E10 Uridine	E11 Adenosine	E12 Inosine
F1 Adonitol	F2 L-Arabinose	F3 D-Arabinose	F4 β-Methyl-D-Xylopyranoside	F5 Xylitol	F6 Myo-Inositol	F7 Meso-Erythritol	F8 Propylene glycol	F9 Ethanolamine	F10 D,L-α-Glycerol-Phosphate	F11 Glycerol	F12 Citric Acid
G1 Tricarballic Acid	G2 D,L-Lactic Acid	G3 Methyl D-lactate	G4 Methyl pyruvate	G5 Pyruvic Acid	G6 α-Keto-Glutaric Acid	G7 Succinamic Acid	G8 Succinic Acid	G9 Mono-Methyl Succinate	G10 L-Malic Acid	G11 D-Malic Acid	G12 Meso-Tartaric Acid
H1 Acetoacetic Acid (α)	H2 γ-Amino-N-Butyric Acid	H3 α-Keto-Butyric Acid	H4 α-Hydroxy-Butyric Acid	H5 D,L-β-Hydroxy-Butyric Acid	H6 Glycolic Acid	H7 Butyric Acid	H8 2,3-Butanediol	H9 3-Hydroxy-2-Butanone	H10 Propionic Acid	H11 Acetic Acid	H12 Hexanoic Acid

Figure 34. Plan de la plaque phenotype (PM-M1).

Les cellules ont été préparées dans les trois conditions (AA, Ano, 3%O₂) et les expériences sont effectuées dans la chambre du Biosphérix comme décrit en amont. Toute les expériences sont réalisées avec des tampons et des colorants (réactif tétrazolium ; « Redox Dye MC et MB » pour MITOPLATE et « Redox Dye A » pour PM-M1) fournis par Biolog Inc (Hayward, Etats-unis).

Le contenu des solutions est présenté ci-dessous :

MITOPLATE : PLAQUE S1 :

Assay Mix:	Volumes/puit	Volumes/plaque	1.4x extra à pipetter
2x Biolog MAS 2100µl	15µl	1500µl	
6x Redox Dye MC 1400µl	10µl	1000µl	
24x saponin	2.5µl	250µl	350µl
Eau stérile	2.5ul	250ul	350ul
 Volume des puits			
TOTAL	30ul	3000ul	
4200ul			

CELLULE ENTIERE : PLAQUE PM-M1 :

MC-0 :	Volumes pour 100 mL	Volumes pour 15 mL
Biolog IF-M1	100 mL	11, 061 mL
1000x peni-strepto	1.1 mL	165 µl
200mM glutamine	160µL	24 µl
5% SVF	5,3 mL	795 µL
Redox Dye A		3 mL

6.6.1. Mitoplate S-1

La veille de la lecture, tous les réactifs sont déoxygénés et l'assay-Mix ajouté dans la « mitoplate » S1 qui sera placé dans le biosphérix à 0,1% d'O₂ toute la nuit.

Le lendemain, les cellules sont lavées dans du PBS déoxygéné et centrifugées. Les cellules sont resuspendues dans du tampon MAS1X déoxygéné et 30 µL de solution cellulaire sont ajoutés dans les 30 µl déjà présents dans les puits de la plaque pré-incubée la veille.

6.6.2. Plaque PM-M1

Les cellules sont lavées dans du PBS déoxygéné et centrifugées. Les cellules sont resuspendues dans du tampon MC-0 déoxygéné et 60 µl de suspension cellulaire sont ajoutés dans tous les puits de la plaque ainsi que 10µl de Redox Dye MB.

6.6.3. Scellement et lecture des plaques

Les plaques sont ensuite hermétiquement scellées dans des sacs de gaz PM (Biolog Inc, Hayward, Etats-Unis) pour maintenir la concentration d'O₂ la plus basse possible (concentration de 1% d'O₂ pour AA et ANO et 3% d'O₂ pour la condition physiologique).

Les plaques sont ensuite placées dans le lecteur OmniLog (OmniLog PM System ; Biolog Inc., Hayward, Etats-Unis) et incubées pendant 20 h à 37°C.

Le lecteur OmniLog a photographié les plaques PM à intervalles de 15 minutes et a converti la densité de pixels dans chaque puits en une valeur de signal reflétant la croissance cellulaire et la conversion du colorant. La réduction du colorant, qui reflète l'activité métabolique des cellules. Une fois l'analyse terminée, les données de signal ont été compilées et exportées à partir du logiciel Biolog à l'aide de Microsoft Excel. Dans tous les cas, au moins trois analyses répétées des particules ont été réalisées et les valeurs moyennes des signaux sont présentées.

RESULTATS

MAINTENANCE ET SURVIE DES CStroM DE MO EN CONDITION MIMANT L'ISCHEMIE AA, EN ANOXIE ET A 3% D'O₂

Analyse de la prolifération et de la maintenance des CStroM en AA, en ANO et à 3% d'O₂

Après 4 jours de culture, nous avons évalué la prolifération des CStroM de passage P0 ou P1 issus de MO dans les trois conditions expérimentales.

Les résultats montrent une augmentation régulière, du nombre de cellules, au cours des 7 jours de culture en condition physiologique optimale (3% d'O₂) donnant un temps de doublement (TD) de 1 ± 0.1 à 3 jours de culture et 2 ± 0.1 à 5 et 7 jours de culture.

En conditions d'anoxie, après un délai de deux jours, l'augmentation du nombre de cellules a suivi une tendance similaire à celle observée à 3% d'O₂ (TD = 1 ± 0.1 à partir de 3 jours de culture).

De façon intéressante, l'absence simultanée de glucose et d'O₂ (AA) dans le milieu de culture n'a pas entraîné de réduction du nombre de cellules, mais plutôt leur maintien par rapport au niveau initial à J0 (Figure 35).

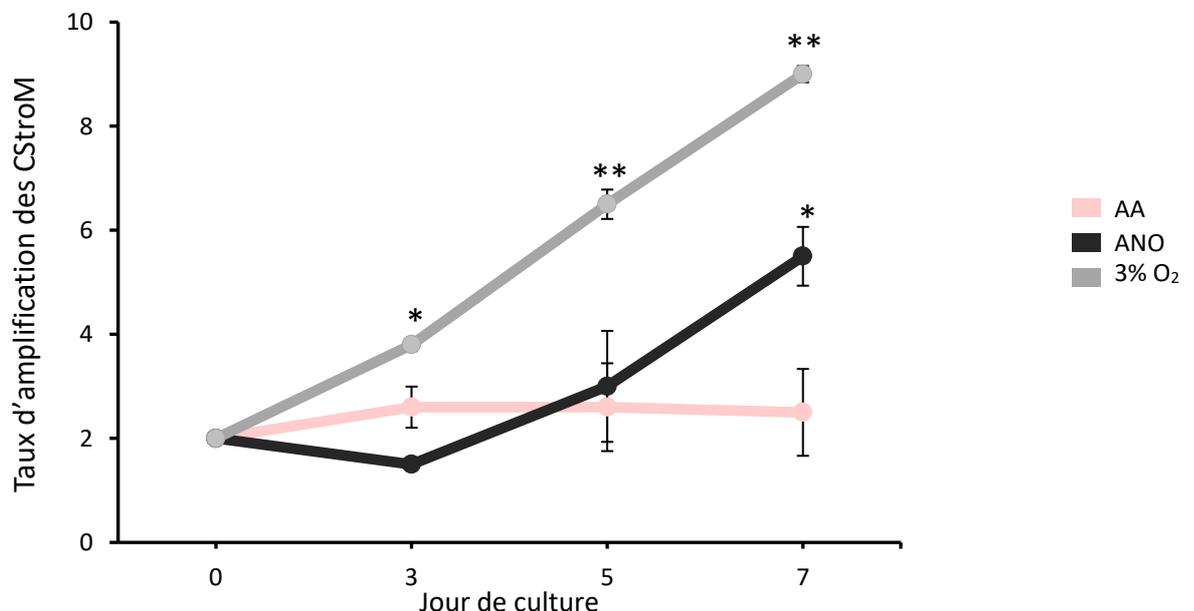


Figure 35. Prolifération et expansion des CStroM de MO en AA, ANO et à 3% d'O₂. La courbe représente l'évolution du nombre total de CStroM obtenu à différents temps pendant 7 jours de culture des cellules incubées en AA, ANO et à 3% d'O₂. Chaque point est présenté comme une moyenne \pm Erreur-Standard (ES) de plus de 10 expériences. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Analyse de la distribution des CStroM, issus des cultures incubées en AA, en ANO et à 3% d'O₂, dans les différentes phases du cycle cellulaire

Pour pouvoir expliquer le potentiel prolifératif des CStroM observé, nous avons effectué l'analyse du cycle cellulaire au bout de 5 jours d'incubation (Figure 36). Nos résultats montrent que la distribution des CStroM dans les différentes phases du cycle cellulaire (G0, G1, SG2M) est similaire entre les trois conditions expérimentales. De plus, l'incubation des CStroM en AA et ANO ne modifie pas leur capacité à entrer dans le cycle cellulaire actif, particulièrement dans les phases de division cellulaire (SG2M).

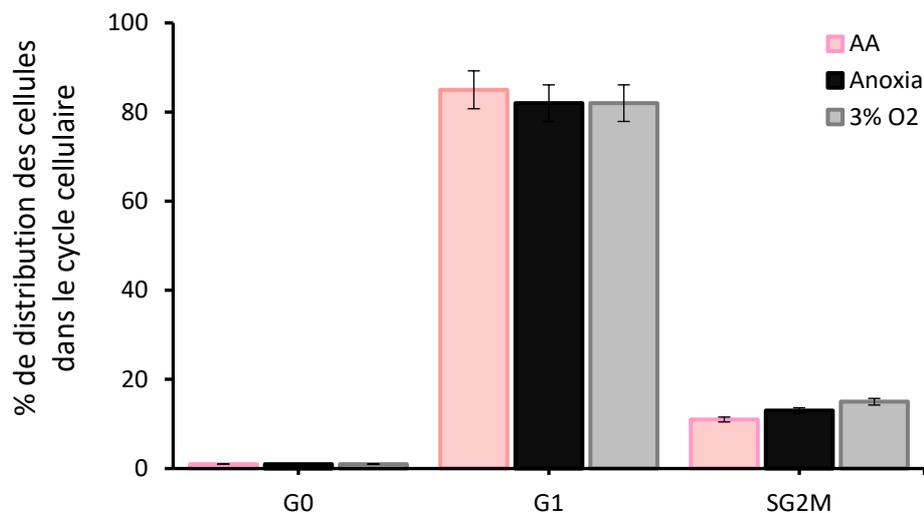


Figure 36. Analyse de la distribution des phases du cycle cellulaire des CStroM de MO en AA, ANO et à 3% d'O₂. Les barres représentent le pourcentage moyen \pm ES de 6 expériences indépendantes de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire détectées après 5 jours d'incubation en AA, ANO et à 3% d'O₂, par cytométrie en flux en utilisant un marquage Ki67/IP.

Analyse de la viabilité cellulaire des CStroM au cours de la prolifération en AA, en ANO et à 3% d'O₂

Afin d'expliquer pourquoi la présence de CStroM dans les phases actives du cycle cellulaire ne résulte pas en une expansion des cellules en AA au lieu de leur maintenance (Figure 35), l'analyse de la viabilité cellulaire a été effectuée (Figure 37). L'apoptose a été déterminée en utilisant le marquage annexinV/IP.

Les résultats montrent que la proportion de cellules en apoptose précoce (Ann⁺/IP⁻) ou tardive (Ann⁺/IP⁺) augmente de manière significative dans la condition d'AA par rapport aux conditions à 3% d'O₂ ou à l'Ano à partir de 11 jours de culture. Cela indique que dans des conditions d'AA, bien qu'elle soit capable de rentrer en phase répliative, une fraction de CStroM meurt par apoptose, ce qui résulte en un maintien du nombre total des CStroM dans cette condition.

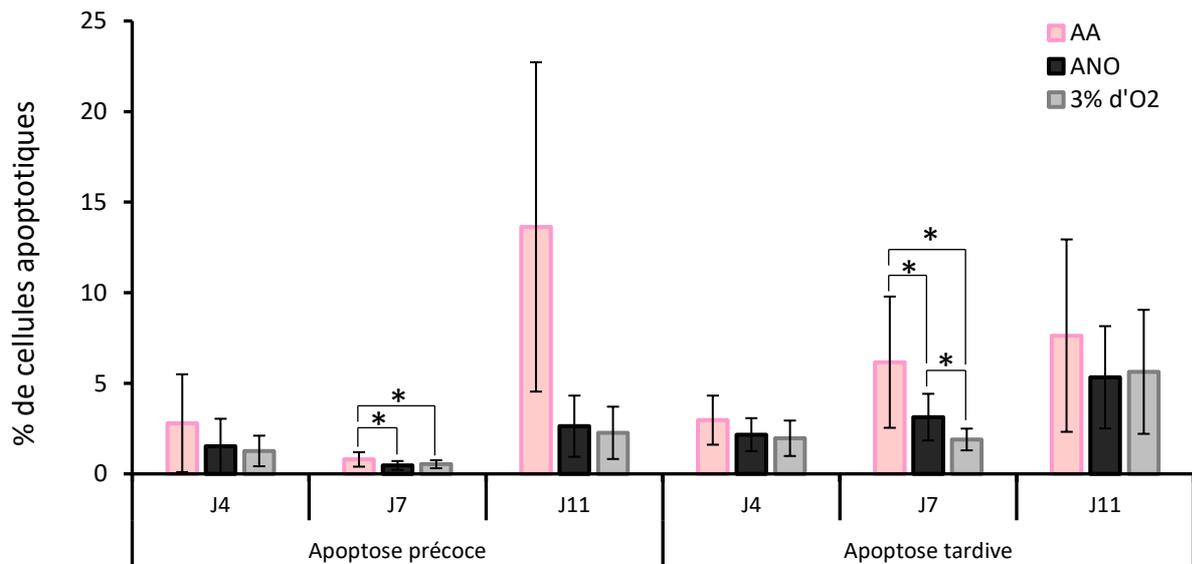


Figure 37. Analyse de l'apoptose après 11 jours de culture des CStrom de MO en AA, ANO et à 3% d'O₂. Les données représentent le pourcentage moyen ± ES de cellules en apoptoses précoces et tardives estimées à un moment donné pendant 11 jours de culture incubées dans AA, anoxie et 3% O₂. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à * $p < 0.05$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Analyse du potentiel d'expansion des CStrom pré-incubées en AA, en ANO et à 3% d'O₂

Après une incubation de 4 à 5 jours en AA, ANO et à 3% d'O₂ (PC), leur capacité d'expansion a été estimée suite à leur transfert dans une condition de culture physioxique à 3% d'O₂. Cette étude a montré que les CStrom issues de la pré-incubation en AA ou en Anoxie, présentent une augmentation significative de la capacité d'expansion par rapport à celles issues de la préincubation en physioxie (Figure 38). Ainsi, le taux d'expansion dans les conditions extrêmes s'élèvent à 3 ou 4 fois plus (Taux d'amplification au jour 11: AA, 14 ± 0.8 ; Anoxie, 13 ± 0.9 ; 3% O₂, 5 ± 0.1).

Dans l'ensemble nos résultats suggèrent l'existence de fractions de CStrom capable de survivre et proliférer dans des conditions d'AA ou d'Anoxie. De plus, ces fractions cellulaires possèdent également une forte capacité proliférative ce qui suggère leur primitivité.

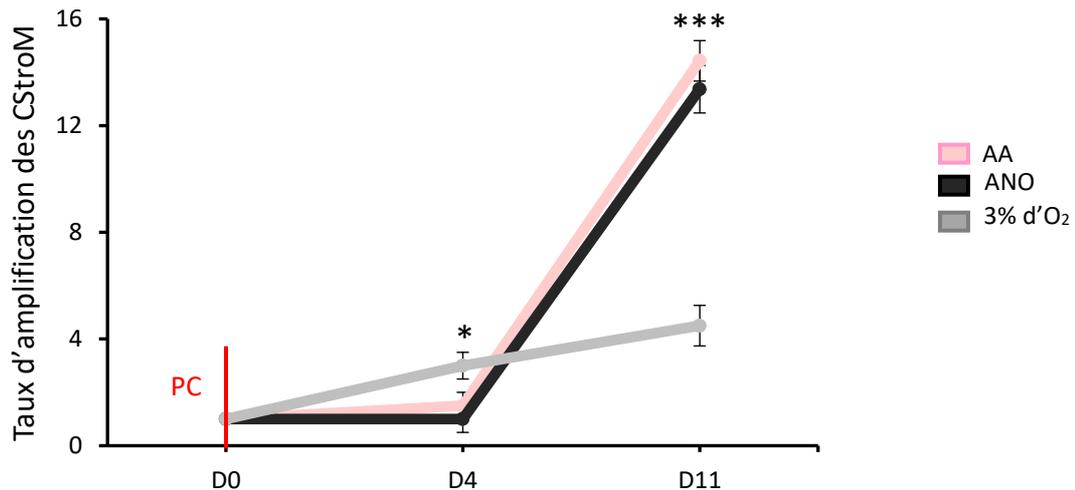


Figure 38. Analyse du potentiel d'expansion des CStrom pré-incubées en AA, en ANO et à 3% d'O₂ pendant 7 jours (PC) puis remise en culture (J0) pendant 11 jours à 3% d'O₂. La courbe représente le taux d'amplification moyenne (expansion) à un moment sélectionné ± ES à partir de 6 expériences indépendantes par rapport au niveau J0. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Analyse fonctionnelle « single-cell » des CStrom issus des cultures incubées en AA, en ANO et à 3% d'O₂

Les CStrom sont une population hétérogène (Ivanovic, 2023). Pour pouvoir vérifier si les conditions anoxiques ont permis d'enrichir les populations de CStrom en cellules plus primitives (conditions permettant leur survie) par opposition aux cellules plus matures, nous avons réalisé l'analyse fonctionnelle de cellules individuelles (technique d'analyse « single-cell »). Après une incubation de 4/5 jours des CStrom totales dans les différentes conditions expérimentales, les suspensions cellulaires de chaque condition sont récupérées et reencensées en nouvelle culture avec une cellule par puit pour pouvoir estimer la capacité clonogénique d'une cellule individuelle.

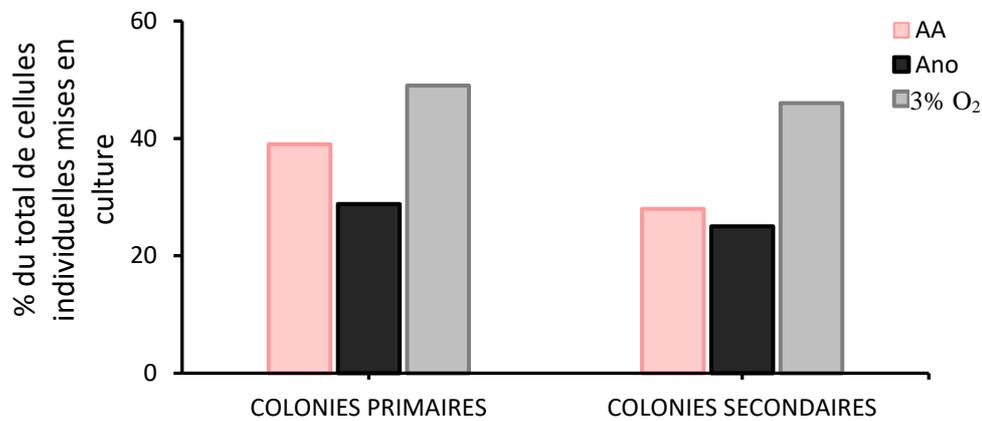
En effet, ce test permet de déterminer la proportion de cellules progénitrices capables de générer des colonies primaires (un équivalent des CFU-F formant des colonies fibroblastiques). De plus, l'estimation de la capacité clonogénique de colonies primaires repiquées dans de nouvelles cultures donne la proportion de CStrom initiale donnant à la fois des colonies primaires et secondaires. Seules les cellules les plus primitives capables de s'auto-renouveler et possédant une capacité proliférative élevée peuvent donner à la fois des colonies primaires et secondaires. De plus, la capacité de différenciation de colonies primaires vers les trois lignages cellulaires (ostéo-, adipo-, chondrogénique) révèle la présence de cellules initiatrices multipotentes.

En conclusion, une cellule individuelle dotée de la capacité d'auto-renouvellement, d'un potentiel prolifératif élevé et de multipotence représente une cellule similaire/identique à la CSM. Sur cette base, ce test permet d'identifier des CSM en culture *ex vivo*.

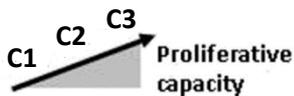
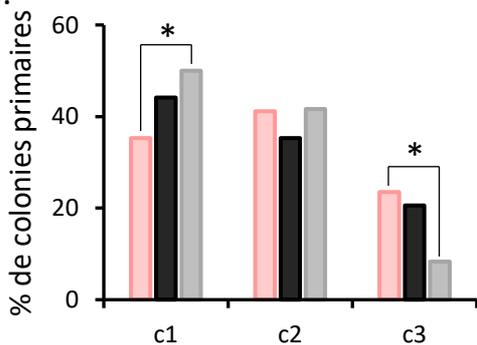
Nos résultats ont montré qu'il n'y avait aucune différence dans la proportion de cellules individuelles produisant les colonies primaires et secondaires entre nos conditions expérimentales (Figure 39A). Mais, en gardant à l'esprit que la taille de la colonie est proportionnelle à la capacité proliférative du progéniteur à l'origine de la colonie. L'analyse de la taille des colonies montre un plus grand pourcentage de colonie de type C3 (colonies les plus grandes) pour les colonies primaires et une tendance pour les colonies secondaires en condition d'AA (Figure 39 B, D). De plus, la multipotence des colonies primaires a montré que la proportion de progéniteurs tripotents, bipotents et unipotents ne diffèrent pas selon les conditions expérimentales.

Dans l'ensemble, ces résultats révèlent que les CSM multipotentes avec une capacité de prolifération élevée sont enrichies dans la population CStroM issue de la condition AA.

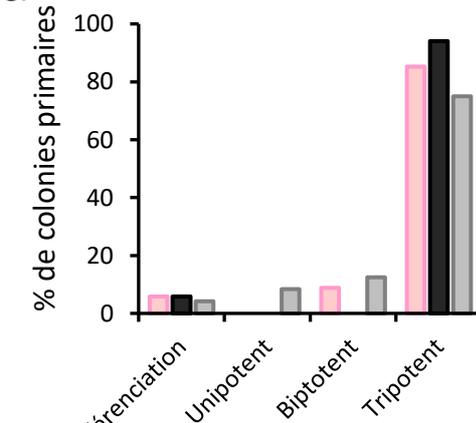
A.



B.



C.



Différenciation

D.

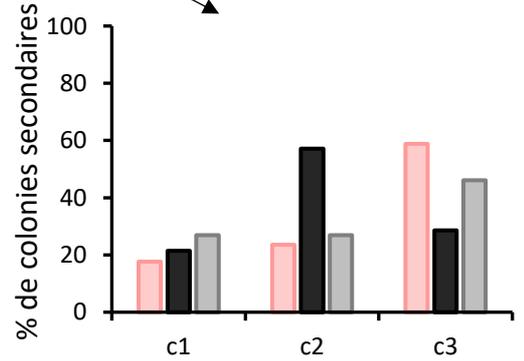


Figure 39. Analyse du potentiel prolifératif et clonogénique des CStrom en AA, ANO et à 3% d'O₂. Des CStoM individuelles ont été incubées en AA, ANO et à 3% d'O₂ pendant 5 à 7 jours. A. Le potentiel de prolifération a été testé en sélectionnant des cellules individuelles de chaque condition expérimentale et en les plaçant dans des puits individuels. La descendance cellulaire produite en culture primaire à partir d'une cellule individuelle a été réensemencée et la production de cellules en culture secondaire a été évaluée. Les résultats sont affichés avec des barres représentant le pourcentage du total de cultures de cellules individuelles identifiées donnant naissance à des colonies primaires ou secondaires. B. Des catégories de clones ont été établies en fonction du nombre de cellules produites : (C1 = 0 ; C2 = 1 000 à 4 000 ; C3 = 5 000 à 10 000 ; C4 = 13 500 à 14 000 ; C5 = 15 000 à 15 500 cellules). Les données sont présentées avec des barres représentant le pourcentage du total de clones de cellules individuelles identifiées en fonction de leur taille pour les colonies primaires. C. Potentiel différentiel. Le contenu cellulaire de chaque puit donnant une colonie primaire a été divisé en trois puits distincts. Chaque contenu cellulaire des trois puits a ensuite été soumis à une voie de différenciation grâce à l'ajout d'un milieu de différenciation pour la différenciation adipo-, chondro-, et ostéo-génique. Les barres représentent le pourcentage de clones uni-, bi-, tri-potents ou sans potentiel différentiel. C. Tailles des colonies secondaires (voir B). Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à * $p < 0,05$, test du χ^2 .

Analyse de l'expression des gènes de primitivité dans la population de CStrom issus des cultures incubées en AA, en ANO et à 3% d'O₂, dans les différentes phases du cycle cellulaire

Pour confirmer que la « capacité souche » a été sélectionnée dans la condition AA, nous avons estimé l'expression de gènes connus pour être surexprimés dans des populations de CS (Roobrouck et al., 2011). En comparaison au niveau d'expression génique à J0, nous avons observé une expression plus élevée des gènes *C-MYC*, *NOTCH1* et *OCT3/4* en Anoxie et en particulier en AA comparé à la conditions physioxique à 3% d'O₂ (Figure 41). Il est à noter que *HIF1 α* moins élevé en condition d'AA comparée à 3% d'O₂.

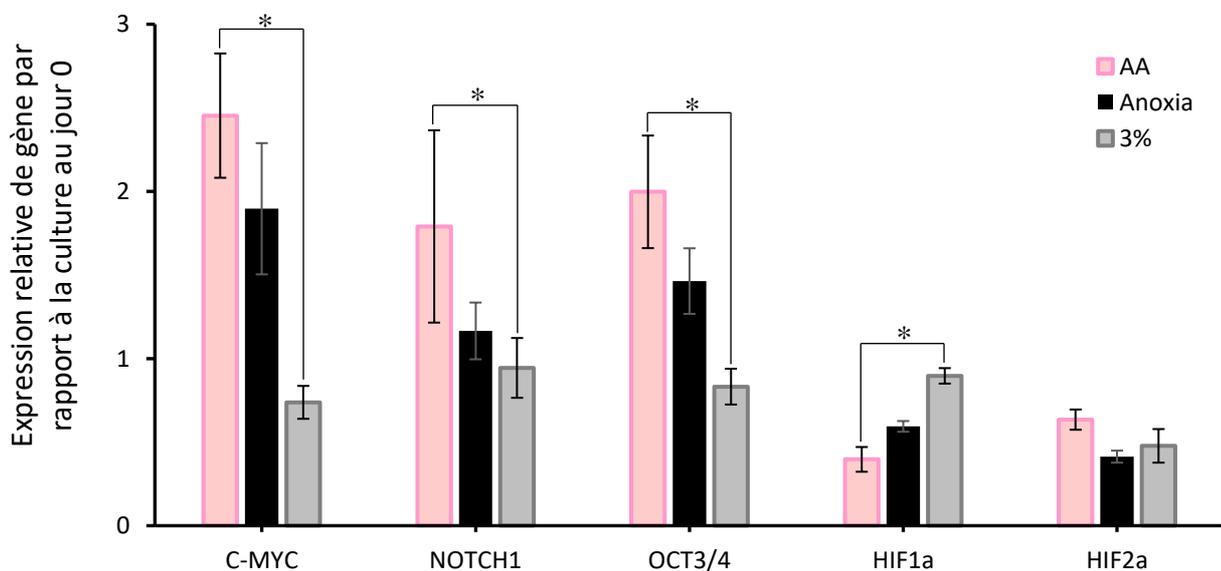


Figure 40. Analyse de l'expression des gènes de primitivité des CS sur une population de CStrom incubée en AA, ANO et à 3% d'O₂ pendant 7 jours. Les niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes *C-Myc*, *Notch1*, *OCT3/4*, *HIF1a* et *HIF2a*, ont été analysés par RT-PCR et normalisés avec le gène *Hprt*. Les barres représentent l'expression relative moyenne \pm ES par rapport au niveau d'expression à J0 de 6 expériences indépendantes. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à * $p < 0,05$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Analyse de l'impact de CStrom co-cultivées avec des cellules hématopoïétiques CD34⁺ sur l'activité pré-CFC.

In vivo, les CStrom font partie intégrante de la niche hématopoïétique et régulent le maintien, la prolifération et la différenciation des CSH (Kiel & Morrison, 2008). Afin d'estimer leur influence sur le maintien des cellules hématopoïétiques, des CStrom issues des trois conditions expérimentales (AA, ANO et 3% d'O₂) ont été co-cultivées avec des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺.

Après 10 jours de co-culture (CC), les cellules non adhérentes CD34⁺ ont été séparées en deux pools. Le premier pool représente la descendance totale au jour 10 de 20 000 cellules CD34⁺ étalées au jour 0 (C1). Les cellules C1 sont utilisées pour réaliser un test CFC. Cette analyse a montré qu'une production significativement plus élevée de colonies à J10 de co-culture incubée en AA par rapport à la condition à 3% d'O₂ et en particulier par rapport à l'Ano.

Le deuxième pool est réalisé à partir de 1/5^{ème} du premier pool (C2). Les cellules C2 sont mises en culture pour la détection des pré-CFC, pendant une durée de 5 semaines (CL). La production de progéniteurs engagés lors d'une culture secondaire à long terme (C2) reflète la présence et la quantité d'une population primitive située entre les progéniteurs engagés et les cellules souches (pré-CFC) dans la population C1 (Hammoud et al., 2012; Ivanovic et al., 2002; Kovačević-Filipović et al., 2007).

Chaque semaine de C2, les cellules ont été étalées dans de la méthylcellulose pour détecter les progéniteurs engagés, comme mentionné ci-dessus. La production de progéniteurs primitifs à partir des cultures secondaires est significativement plus élevée en AA par rapport aux cellules issues des co-culture en condition physioxique et en Ano à J5 et J11 des cultures secondaires (Figure 41).

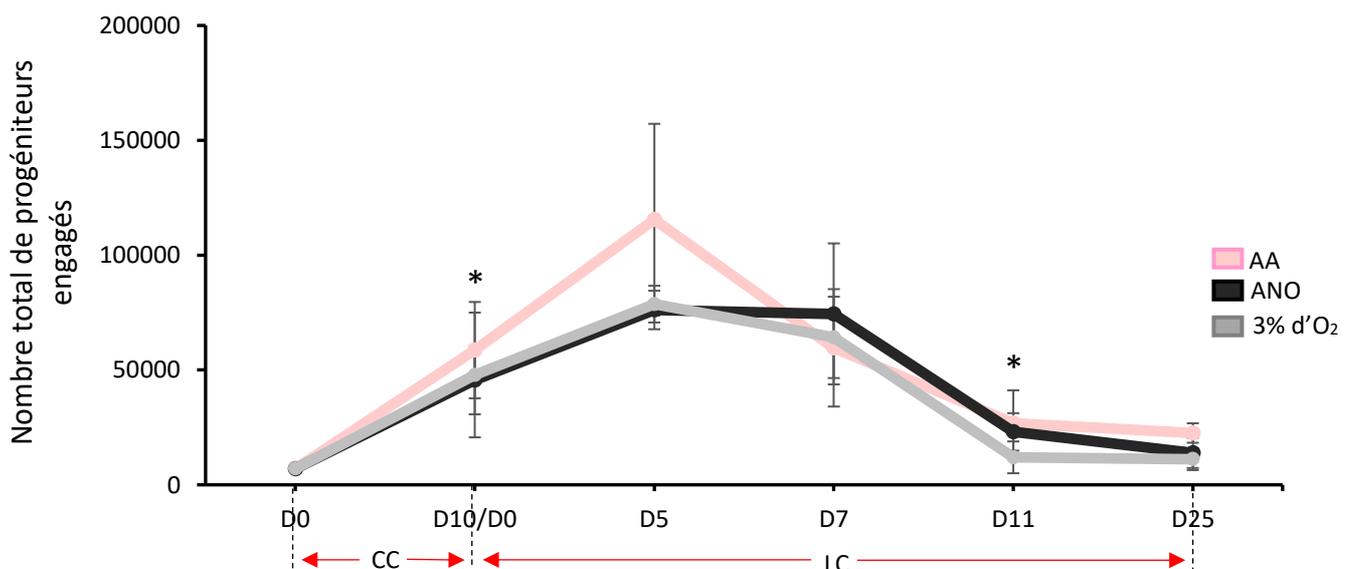


Figure 41. Analyse de l'impact de la co-culture entre CStrom et CD34⁺ sur la production de progéniteurs engagés à partir de pré-CFC. Les courbes représentent les CFC générés au cours de la co-culture (J0 et J10) et de la culture secondaire. Les cultures secondaires ont été initiées avec les produits cellulaires obtenus après 10 jours de co-culture de 20 000 cellules CD34⁺ au jour 0 cultivées sur des CStrom pré-conditionnées en AA, ANO et à 3% d'O₂. Les données de test représentent la moyenne ± ES de quatre expériences indépendantes. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à * $p < 0,05$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

PROFIL BIOENERGETIQUE DES CStrom DE MO EN CONDITION MIMANT L'ISCHEMIE AA, EN ANOXIE ET A 3% D'O₂

Analyse de la masse et du potentiel mitochondrial des CStrom issues des cultures en AA, ANO et à 3% d'O₂

Afin d'expliquer la survie des cellules en condition d'anoxie ou d'AA, nous avons examiné leur profil bioénergétique.

La mitochondrie joue un rôle central dans la bioénergétique cellulaire. Pour évaluer la présence des mitochondries dans les différentes conditions, nous avons coloré le réseau mitochondrial global des CStrom en utilisant des anticorps dirigés contre TOM20, une protéine intégrée dans la membrane externe des mitochondries. La mesure d'immunofluorescence a montré que l'absence d'oxygène induisait une réduction de la masse mitochondriale par rapport à la condition à 3% d'O₂. Mais il est intéressant de noter que l'omission du glucose en plus de l'O₂ n'entraîne pas de réduction du contenu cellulaire en mitochondrie mais une augmentation par rapport à l'anoxie. Le réseau mitochondrial présente un aspect quantitatif et qualitatif similaire de celui observé dans la condition à 3% d'O₂ (Figure 42A).

Ensuite, pour pouvoir vérifier si cet aspect morphologique mitochondrial est associé à leur fonction, l'activité mitochondriale a été évalué par la sonde TMRM. C'est une sonde cationique qui s'accumule dans la matrice mitochondriale de manière dépendante du potentiel membranaire ($\Delta\psi$) (Creed & McKenzie, 2019). Ainsi l'intensité de fluorescence de TMRM est proportionnelle au niveau de polarisation des mitochondries qui reflète leur niveau d'activité (Creed & McKenzie, 2019).

Nos données ont montré que de même que pour le contenu mitochondrial, les CStrom cultivées en condition d'anoxie présentent une activité mitochondriale moyenne considérablement réduite par rapport aux autres conditions expérimentales. Les CStrom de la condition d'AA révèlent une activité significativement supérieure à la condition d'anoxie, qui se rapproche du niveau d'activité détectée à 3% d'O₂ (Figure 42B).

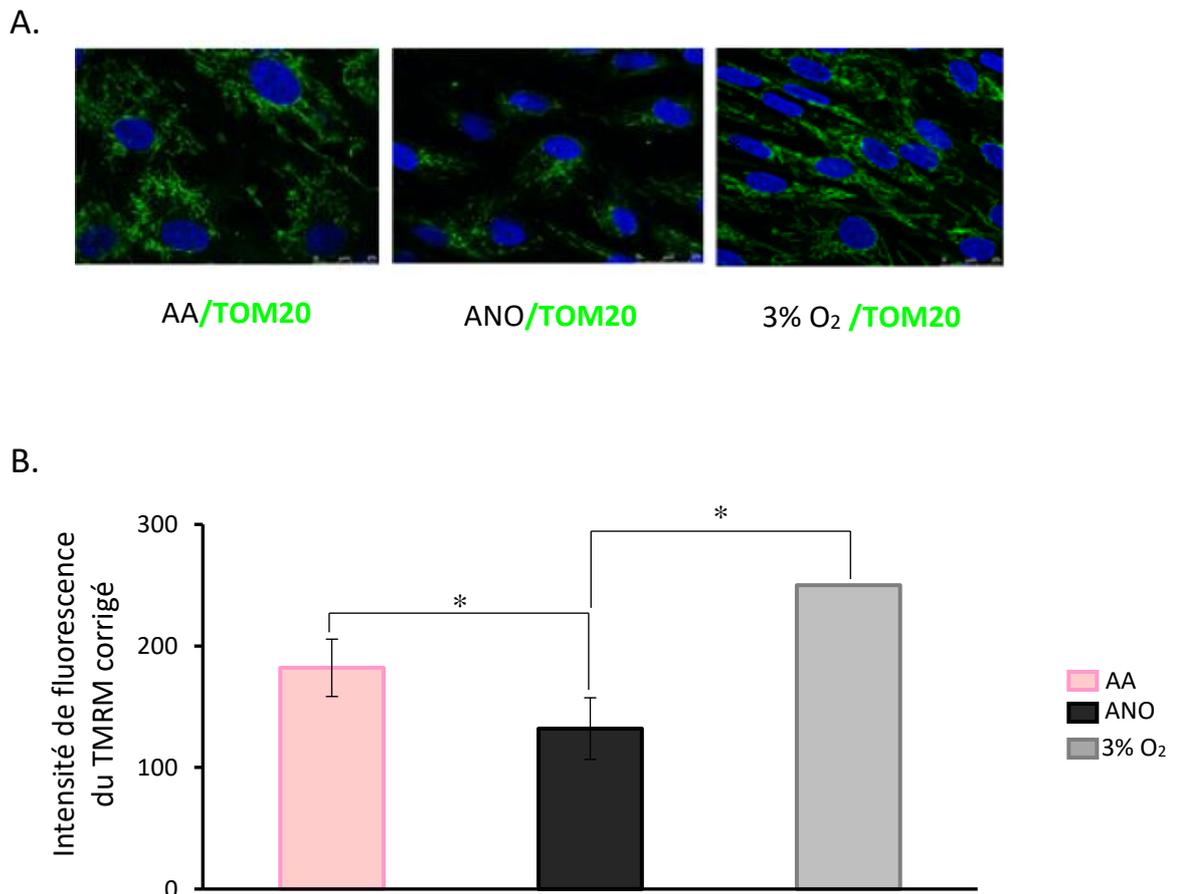


Figure 42. Analyse du contenu et de l'activité mitochondriale de CStrom en AA, ANO et à 3% d'O₂. A. Images d'immunofluorescence représentatives obtenue par microscopie confocale (grossissement x60), marquées contre la protéine TOM20 (vert) et un marqueur nucléaire (Dapi, bleu). Les barres d'échelle sont de 5 μ m. B. Le potentiel de membrane mitochondriale mesuré à l'aide de la sonde TMRM. Les barres représentent l'intensité de fluorescence (MFI) du TMRM corrigée par la MFI détectée après application du 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNP), éliminant la MFI non spécifique aux mitochondries. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à $*p < 0,05$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Analyse de l'affinité des mitochondries pour l'oxygène des CStrom issue des cultures en AA, ANO et à 3% d'O₂.

Nous avons déterminé l'affinité des CStrom pour l'oxygène après 5-7 jours d'incubation sans oxygène pour les conditions AA et ANO.

L'oxygraphe Oroboros mesure la consommation d'O₂ mitochondrial au cours du temps. Ceci reflète l'affinité pour l'O₂ des mitochondries issues des différentes conditions. Le temps nécessaire à la consommation totale d'oxygène est donc inversement proportionnel à l'affinité des mitochondries pour l'oxygène. Cette affinité est représentée par la constante d'affinité Km du CIV de la CRM.

De même que pour la détection de l'activité mitochondriale par la sonde TMRM, la mesure de la consommation d'oxygène par la technique Oroboros montre une augmentation considérable de Km, révélant une réduction significativement importante de l'affinité des cellules pour l'O₂ en anoxie

(Figure 43). Dans les CStroM issues de la condition AA, la valeur de Km est équivalente à celle mesurée à 3% d'O₂. Ceci révèle une grande affinité pour l'O₂ et donc une activité de la CRM bien présente dans la condition mimant l'ischémie.

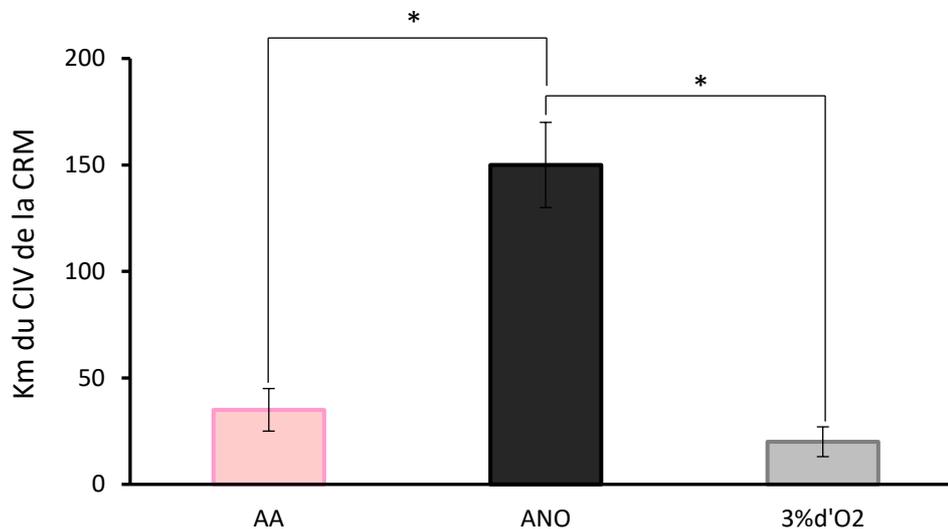


Figure 43. Détermination de l'activité mitochondriale par mesure de leur affinité pour l'oxygène en AA, ANO et à 3% d'O₂. Les barres représentent la moyenne des valeurs de Km de COX (CIV) détectée par l'oxygraphe oroboros de CStroM issues de 5-7 jours de culture en AA, ANO et 3% d'O₂. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à * $p < 0,05$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Analyse de la respiration mitochondriale par Seahorse et de la quantité d'ATP des CStroM issues de culture en AA, ANO et à 3% d'O₂

Dans un premier temps, le contenu en ATP total cellulaire a été mesuré par luminométrie. Cette analyse a montré que la teneur totale en ATP diminuait significativement en anoxie ainsi qu'en AA par rapport à la condition à 3% d'O₂ (Figure 44A).

Ensuite l'analyse est poursuivie par la mesure de la respiration mitochondriale qui a été effectuée par la technologie Seahorse (approche détaillée dans la section mMatériel et Méthodes). La respiration a été mesurée à l'état basal, ainsi qu'à la suite d'ajout de modulateur de la respiration mitochondriale (oligomycine : inhibiteur de l'ATP synthase ; 2,4-DNP : agent découplant; roténone/antymicine : inhibiteur des complexe respiratoires I et III respectivement).

Nos résultats montrent que la respiration basale en condition AA et anoxie est significativement diminuée par rapport à celle mesurée à 3% d'O₂. Cependant, en AA cette respiration est plus importante que celle détectée en anoxie. De plus, les paramètres mitochondriaux de la production d'ATP détectée en présence d'oligomycine et de la capacité de réserve mitochondriale détectée en présence de DNP présentent le même profil (Figure 44B).

Dans l'ensemble, bien que le contenu en ATP total est significativement diminué par rapport aux CStroM issues des cultures à 3% d'O₂, les résultats révèlent que les mitochondries gardent une capacité respiratoire dans les CStroM en condition d'AA. Au contraire, cette capacité respiratoire est inhibée dans les cultures issues de la condition anoxie.

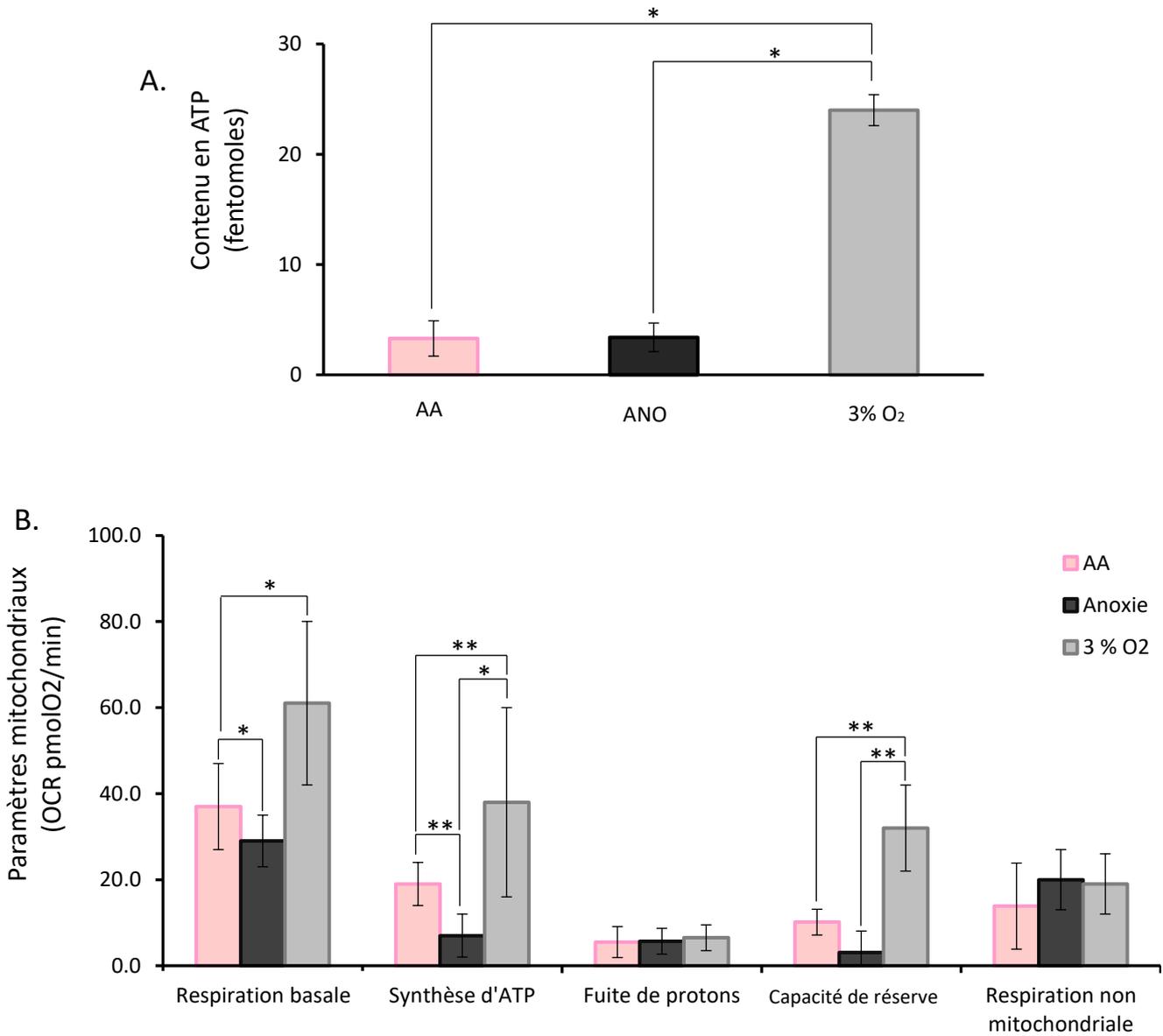


Figure 44. Profil bioénergétique des CStroM incubées pendant 5-7 jours en AA, ANO et à 3% d'O₂. A. Contenu en ATP total. Les barres représentent la moyenne des mesures d'ATP total \pm ES déterminée par l'intensité de luminescence de 6 expériences. B. Les paramètres de la respiration mitochondriale déterminés par la technologie Seahorse. Les barres représentent la moyenne des OCR \pm EM détectés dans l'état basal et après l'ajout de modulateur de la respiration mitochondriale (oligomycine : inhibiteur de l'ATP synthase ; 2.4-DNP : agent découplant; roténone/antimycine : inhibiteur des complexes respiratoires I et III respectivement) de 5 expériences indépendantes. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Analyse de la quantité de lactate extracellulaire des CStroM issues de culture en AA, ANO et à 3% d'O₂

Le contenu en lactate extracellulaire a été mesuré par luminométrie dans les surnageants après 5 jours de culture dans les conditions d'AA, d'anoxie et à 3% d'O₂ (Figure 45). Cette analyse a montré que la production de lactate dans la condition d'anoxie est significativement plus importante par rapport à la condition à 3% d'O₂ et particulièrement par rapport à l'AA.

Ces résultats suggèrent que : (1) en condition anoxique le lactate est produit par la glycolyse, (2) à 3% d'O₂, en condition microaérophile, la production glycolytique de lactate s'accompagne à l'activation de la respiration mitochondriale, (3) sans O₂ et sans glucose la production glycolytique de lactate est complètement inhibée.

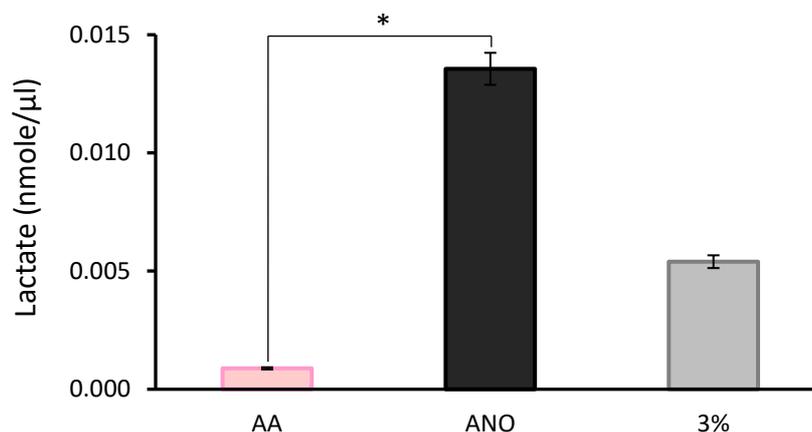


Figure 45. Quantité de lactate des CStroM incubées pendant 5-7 jours en AA, ANO et à 3% d'O₂. Les barres représentent la moyenne du niveau de lactate sécrété dans les milieux de culture ± ES de 3 expériences indépendantes. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à * $p < 0,05$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Tous ces résultats montrent que même si l'absence d'oxygène oriente la bioénergétique cellulaire vers la glycolyse, l'omission simultanée du glucose et de l'oxygène déplace le profil bioénergétique vers une utilisation des voies mitochondriales. Par la suite nous avons effectué des analyses transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques. Les analyses transcriptomiques et protéomiques de chaque condition ont été comparées deux à deux (Ano vs 3% d'O₂, AA vs 3% d'O₂ et AA vs Ano). Chaque analyse a donné un ensemble de gènes et protéines significativement différenciellement exprimés entre les conditions expérimentales. Ces données ont ensuite été classées avec l'utilisation des programmes

ProteoRE et DAVID permettant l'identification des groupes de gènes ou protéines impliqués dans les processus biologiques spécifiques (clusteur) identifiés dans les bases de données GO et KEGG.

Analyse transcriptomique, protéomique et métabolomique des CStroM issues des cultures en ANO et à 3% d'O₂

L'analyse transcriptomique et protéomique a identifié 58 gènes et 162 protéines exprimés de manière significativement différente dans l'anoxie par rapport à 3% d'O₂ (valeur de p ajustée <0,05). Les analyses GO et KEGG permettant de regrouper les gènes et protéines sélectionnés par des processus biologiques spécifiques, ont été présentées sous forme de graphe d'enrichissement (Figure 46, Figure 60/Annexe 1 et Figure 63/Annexe 4).

Ainsi, le protéome a révélé que le métabolisme de dégradation des sucres (glycogène, mannose), de la glycolyse et de la gluconéogenèse, de la voie des PP, des acides aminés (spécialement les acides aminés ramifiés), des nucléotides et de la voie de signalisation HIF-1 est particulièrement engagé dans la survie des CStroM en anoxie par rapport à la condition à 3% d'O₂.

L'analyse protéomique a révélé un groupe comprenant des enzymes impliquées dans la réponse métabolique à la diminution du niveau d'O₂, dont l'expression est principalement régulée par le facteur de transcription HIF stabilisé (MMP14, NDRG1, FTH1, FTL, PFKFB3, PFKP, PGK1, ALDOA, ENO2, PGM1, TPI1, PFKL, GAPDH, ENO1, GPI, LDHA). Parmi eux nous pouvons constater une surexpression de la ferritine qui réduit le niveau de fer libre protégeant les cellules contre la ferroptose ainsi que la protéine NDRG1 ayant une action anti-apoptotique (Joshi et al., 2022).

La comparaison de la variation du log₂FoldChange (Log₂FC représentant le ratio des valeurs de chaque gène ou protéine d'une condition par rapport à une autre) de chaque gène ou protéine différentiellement exprimée en anoxie par rapport à la condition physioxygène montre que la majorité des enzymes glycolytiques/glyconeogéniques sont significativement augmentées (PFKFB3, PFKP, PGK1, ALDOA, ENO2, TPI1, PFKL, GAPDH, ENO1, GPI, LDHA ; variation Log₂FC > 0,2). Ces résultats sont associés à une diminution des métabolites glycolytiques (G6P, F6P, FruBP, 2PG3PG), quantifiés par une analyse métabolomique non ciblée. Ceci indique leur consommation pour la production d'énergie et d'autres voies anaboliques pour fournir des substrats pour la synthèse d'acides nucléiques, d'acides aminés et de lipides (T. J. Wang et al., 2011), (Figure 49 et Figure 66/Annexe 7). En revanche, le G3P est accumulé dans cette condition par rapport à 3% d'O₂ (Figure 49 et Figure 66/Annexe 7). Entre autre, cela peut suggérer que, en absence d'O₂ et donc de respiration mitochondriale, le G3P n'est pas consommé pour la régénération du NAD par les enzymes mitochondriales (S. Liu et al., 2021).

Nos résultats montrent que la dégradation de sucres complexes est engagée en anoxie pour pouvoir alimenter la glycolyse (Figure 46A, B et 48 et Figure 64/Annexe 5, Figure 65/Annexe 6). Ainsi une stimulation d'expression d'enzymes de la dégradation du glycogène (PGM1, GBE1) et du métabolisme des sucres complexes tels que la voie des hexosamines donnant les précurseurs pour la synthèse des protéoglycanes et des glycolipides (UAP1, CMAS) a été détectée. PGM1 permet d'alimenter la glycolyse à partir du G1P issu de la dégradation du glycogène pour donner du G6P. En accord avec ces résultats, les métabolites issus de la dégradation du glycogène, du mannose ou des sucres aminés (UDP-AcGlcN, UDP-Glc, Man6P, GDP-Man, GLcNAC6P) sont fortement diminués (Figure 49 et Figure 66/Annexe 7).

En ce qui concerne l'activité mitochondriale, comme attendu, en absence d'oxygène, le protéome révèle une diminution de l'expression des complexes de la CRM (en particulier les sous unités du CI, NDFUS2, NDFUS1, NDFUS4, NDFB4, NDFB9, NDFB3 et le CIV, COX5B), des enzymes du cycle de Krebs (SUCL2, IDH3A), de la protéine d'import/export d'ADP/ATP (SLC25A5) et la réduction globale des protéines ribosomales mitochondriales et par conséquent de la synthèse des protéines mitochondriales. Le transcriptome révèle une diminution du gène codant une sous-unité de l'ATP synthase (*MT-ATP8*). La réduction de l'activité de l'ATP synthase et des complexes mitochondriaux générateurs de ROS est observée dans de nombreux organismes anaérobies, afin de maintenir un hypométabolisme nécessaire à la survie dans des conditions d'anoxie prolongée (Galli & Richards, 2014). En revanche, un gène codant une sous-unité du CIV est trouvé sur-exprimé (*NDUFA4*). Cette sous-unité a été retrouvée comme sous exprimée dans certains cancers (notamment les carcinomes rénaux) et serait responsable d'une réduction de la respiration mitochondriale médiée par une inhibition du CI de la CRM (Tello et al., 2011). En conséquence, la majorité des métabolites du cycle de Krebs sont aussi considérablement réduits par rapport à la condition à 3 % d'O₂ (αKG, fumarate, malate et en particulier le succinate (Figure 49 et Figure 66/Annexe 7).

Les coenzymes et les cofacteurs (ATP/ADP, NAD(P)⁺/NAD(P)H, FAD/FADH₂, CoQ/CoQH₂, LA/DHLA) jouent un rôle clé dans la régulation des activités enzymatiques pour maintenir l'homéostasie cellulaire (Thapa & Dallmann, 2020). L'analyse du groupe concernant les processus métaboliques des coenzymes et cofacteurs (Figure 46B), montre que leur production et leur recyclage sont assurés par la stimulation de la voie glycolytique et par une diminution des enzymes du cycle de Krebs et de la respiration mitochondriale en anoxie par rapport à 3% d'O₂. De plus, l'analyse de transcriptome et du protéome révèle que des gènes (*NAMPT*) et des enzymes impliquées dans le métabolisme des nucléotides (NT5E, ASMTL, AK4, ADSL, NUDT16) et la voie de régénération du NAD (PFKP, PGK1, PFKL, ALDOA, ENO2, PGAM1, TPI1, NAMPT, GAPDH, ENO1, NT5E, GPI) sont surexprimées, ce qui indique leur implication principale dans le métabolisme de recyclage des coenzymes/cofacteurs (Figure 46 et et Figure

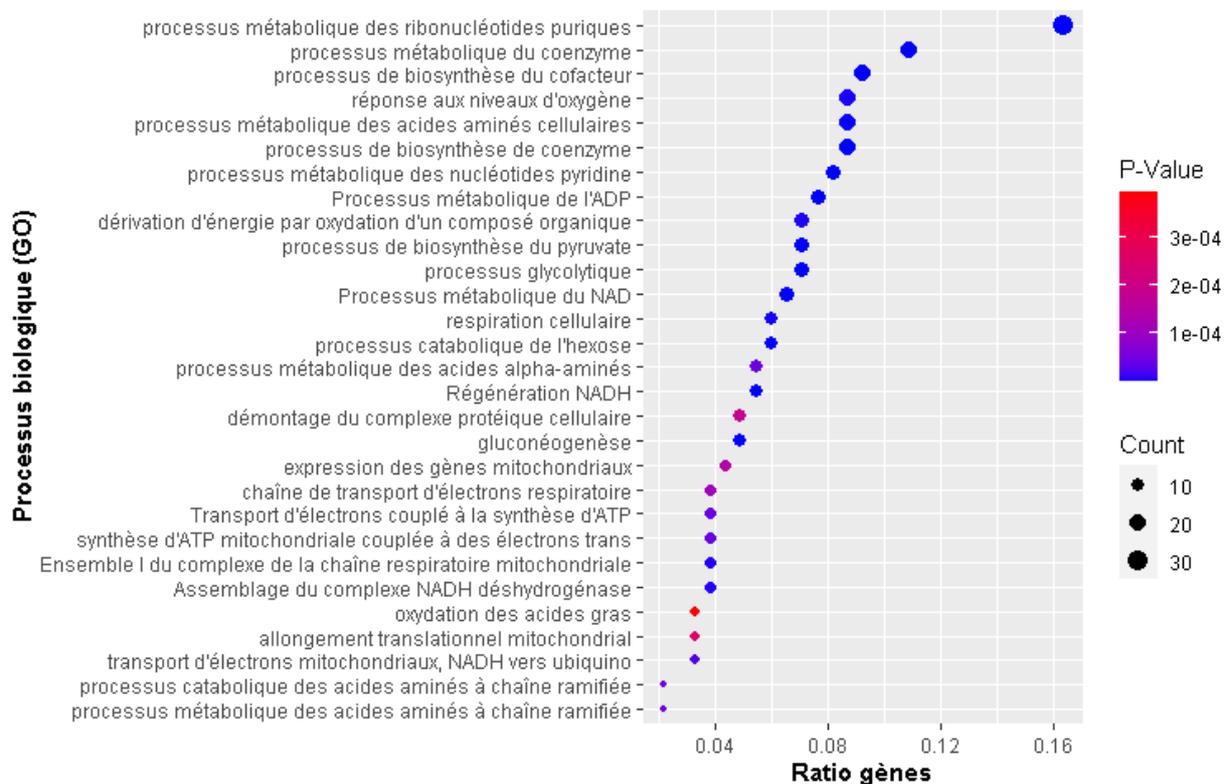
54/Annexe 1 et Figure 57/Annexe 4). Ainsi, l'enzyme NAMT convertit le nicotinamide (NAM) en nicotinamide mononucléotide (NMN) en utilisant l'intermédiaire métabolique PRPP, suggérant la nécessité de la voie des PP pour la survie cellulaire en cas d'anoxie (Khaidizar et al., 2021). De plus, il est intéressant de noter qu'il y a une augmentation de l'enzyme membranaire mitochondriale NADH cytochrome b5 réductase 3 (CYB5R3), qui catalyse le transfert réversible des électrons entre le NADH (issu de divers processus tel que l'élongation et désaturation des AG, la biosynthèse du cholestérol) et la CoQ (Diaz-Ruiz et al., 2018), contribuant ainsi au recyclage des coenzymes NAD/NADH. L'analyse du métabolisme a révélé l'accumulation de l'orotate (Figure 49 et Figure 66/Annexe 7), intermédiaire de la voie de synthèse des pyrimidines produit par la DHODH qui convertit le DHO en orotate. La conversion de l'orotate en orotate 5'monoP dépend du PRPP. Ainsi, on peut suggérer que la voie PP est réduite dans le sens où tout le glucose est utilisé pour la production d'énergie où ce PRPP est utilisé pour la biosynthèse des nucléotides et des coenzymes (NAD⁺ et NADP⁺). En conséquence, le métabolisme de l'orotate est bloqué en raison du manque de substrat enzymatique (PRPP).

Tous ces éléments indiquent que les CStroM en anoxie ont une respiration mitochondriale diminuée et une production énergétique assurée par la glycolyse.

En ce qui concerne le métabolisme des AG en anoxie, nous avons observé une augmentation des enzymes multifonctionnelles peroxysomales DECR1 et ACAA1, ainsi qu'une réduction de l'ACADM mitochondriale et une régulation positive de l'APPL2 mitochondriale de la β -oxydation. Ceci indique une oxydation préférentielle des AG mono et polyinsaturés dans les peroxysomes en anoxie. L'acétyl-CoA, produit dans le peroxysome pourra être transféré dans le cytosol pour la synthèse d'AG ou dans la mitochondrie pour la synthèse des corps cétoniques. Ainsi nous avons détecté la surexpression de ACAT1 mitochondriale qui catalyse la première étape β -hydroxybutarate par l'enzyme β -hydroxybutarate déshydrogénase. L'acétone pourrait être utilisé comme source de carbone pour la gluconéogenèse. En outre, en anoxie, l'augmentation de l'expression du gène *LPIN3*, codant pour l'enzyme phosphatidate phosphatase qui catalyse la conversion du 1,2-dyacyl glycérol3P en 1,2-dyacylglycérol, indique que la synthèse d'AG à base d'acétylCoA peroxysomal pourrait être orientée vers la biosynthèse des triglycérides, de la phosphatidilcholine et de la phosphatodyléthanolamine à partir du G3P. De plus, le métabolisme des lipides et des corps cétoniques en anoxie est associé à la régulation positive de l'enzyme IBCH qui participe à la dégradation des acides aminés ramifiés et au métabolisme du propanoate, qui fournissent l'acétylCoA et l'acétoacétate. Associés à la production d'AG, un gène de la voie de production des sphingolipides (*B3GALT4*) est aussi détecté comme surexprimé dans les CStroM en Ano par rapport à 3% d'O₂.

L'analyse du métabolome (Figure 49 et Figure 66/Annexe 7) a révélé que tous les acides aminés sont diminués en Ano par rapport à 3 % d'O₂, ce qui suggère leur utilisation comme substrat énergétique pour la gluconéogenèse, dégradé en acétylCoA ou en pyruvate. Par exemple, la concentration la plus faible est associée à l'Asp, révélant son utilisation intensive dans les différentes voies métaboliques pouvant notamment être associées avec la détection de la surexpression de l'enzyme ASNS (avec production de glutamate). En revanche, il existe une tendance à l'accumulation de Pser qui pourrait être le résultat d'une réduction de son utilisation par le cycle des folates, la synthèse des purines et des pyrimidines, le métabolisme des sulfides/glutathion mais aussi la synthèse des céramides et de la sphingosine. En ce qui concerne les acides aminés, les enzymes impliquées dans le métabolisme de la proline et du glutamate (ALDH18A1, ALDH4A1) et du métabolisme de la lysine/triptophane (GCDH), sont retrouvées sous-exprimées en Ano.

A.



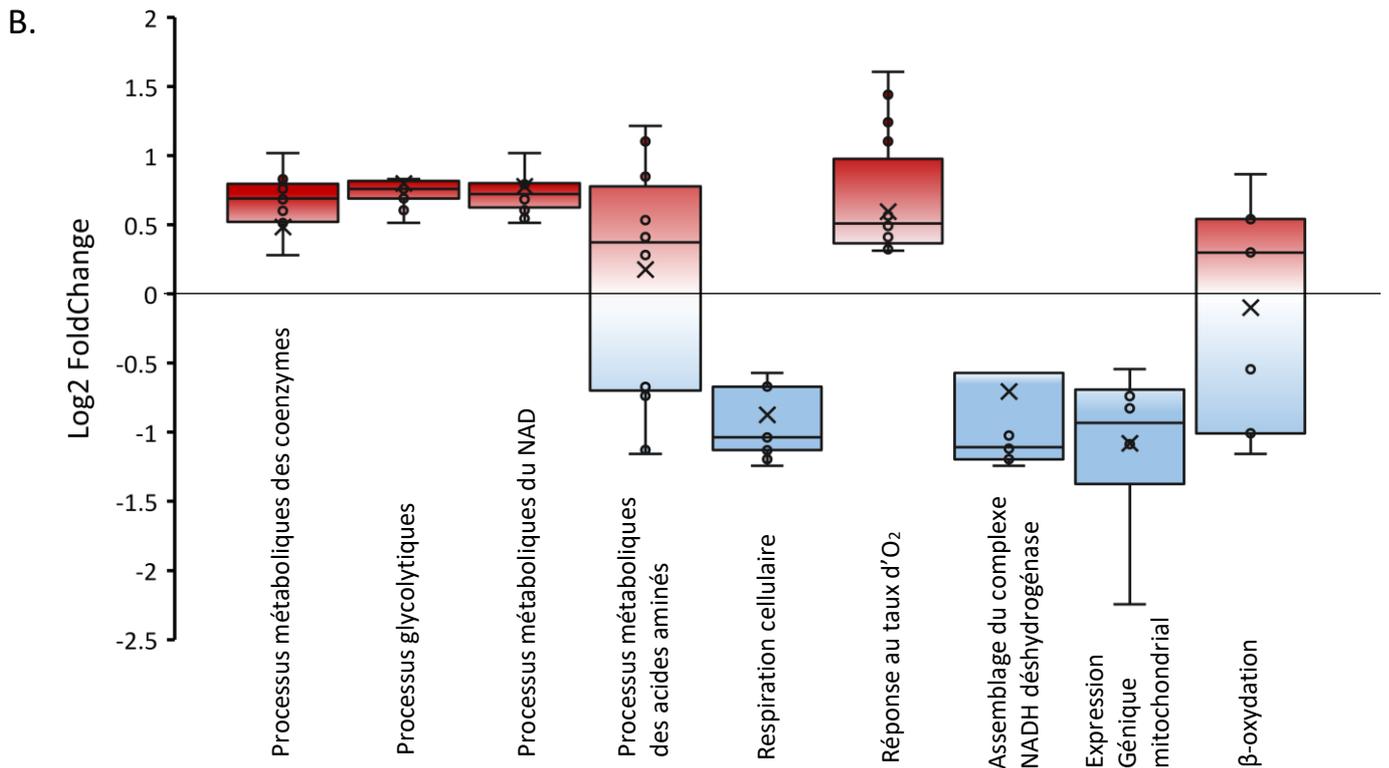


Figure 46. Analyses protéomiques des CStroM incubées pendant 5-7 jours en ANO et à 3% d'O₂. A. Les résultats sont présentés sous forme de Dotplot d'enrichissement à partir de l'analyse fonctionnelle de classification clusterProfiler des processus biologiques à partir des catégories GO (« gene ontology) du logiciel ProteoRE. Chaque boule représente un processus biologique où la taille de la boule représente le nombre de protéines retrouvées différemment exprimées dans le protéome. Les processus biologiques sont classés en fonction du ratio des gènes trouvés différemment exprimés par rapport à la totalité des gènes appartenant à la catégorie GO. La P-value est représentée en dégradé de couleur ou elle représente la valeur de positivité de l'enrichissement par rapport au seuil ($p < 0,05$). B. Boite à moustache représentant la surexpression et la sous expression des différentes protéines de différentes catégories de processus biologiques du Dotplot A. La valeur de l'expression protéique est calculée en \log_2FC compris entre 0,6 et -0,6.

Analyse transcriptomique, protéomique et métabolomique des CStroM issues des cultures en AA et à 3% d'O₂

L'omission simultanée de glucose et d'O₂ induit d'autres changements métaboliques par rapport à la physioxie. Nous avons détecté 219 protéines et 505 gènes différemment exprimés par rapport à 3% d'O₂ (figure supplémentaire). Des groupes contenant des protéines et des gènes impliqués dans les processus biologiques spécifiques sont présentés dans le graphe d'enrichissement (Figure 47A et Figure 61/Annexe 2, Figure 64/Annexe 5).

En condition d'AA, nous observons une surexpression de la majorité des gènes et enzymes de la glycolyse/gluconéogenèse par rapport à 3% d'O₂ (*HK1*, *HK2*, *GPI*, *PFKL/P*, *PFKP*, *ALDOA*, *TPI1*, *GAPDH/S*, *PGK1*, *ENO1/2*, *ENO2*, *ENOF51*). En revanche, l'augmentation de l'expression de *PHDB* observée dans la condition d'AA suggère que le pyruvate de la glycolyse n'est pas transformé en lactate (condition

d'Ano) mais converti en acétylCoA, permettant son entrée dans le cycle de Krebs. Cette réaction s'accompagne d'une réduction de NAD⁺. Ceci est associé avec une augmentation de la production de pyruvate par rapport à l'anoxie, atteignant les niveaux détectés en physioxie (Figure 49 et Figure 66/Annexe 7).

En condition anoxique et en absence de glucose dans le milieu, l'analyse protéomique et transcriptomique montrent une surexpression des enzymes et des gènes impliqués dans la dégradation des sucres complexes (GBE1, MPI, MAN1B1, UGP2, *PFKB3*), et des sucres aminés (*HEXB*, *UAP1L1*, *UAP1*, *AMDHD2*, *GFPT1*, *GNPDA1*). Cela indique que, en absence de glucose dans le milieu, les cellules activent la dégradation des sucres de réserve pour obtenir du glucose mais aussi d'autres monosaccharides (fructose, mannose, galactose) qui alimentent la glycolyse. Les métabolites faisant le lien entre la voie de dégradation du mannose (Man6P), du glycogène (UDPGlc), de la voie des hexosamines (UDPAcGlcN, GlcN6P) et de la glycolyse, ainsi que tous les métabolites glycolytiques (2PG3PG, 3glycérol phosphate, fru6P, FUBP) sont significativement diminués par rapport à 3%O₂ ainsi que par rapport à l'anoxie (Figure 49 et Figure 66/Annexe 7). Cela suggère la consommation de la majorité des sucres de réserve permet le maintien de l'homéostasie cellulaire dans la condition mimant l'ischémie. En revanche le GDPMan (dégradation des sucres nucléotides) et le G6P (produit de la première réaction glycolytique) s'accumule dans la condition d'AA (Figure 49 et Figure 66/Annexe 7).

De la même manière que l'anoxie, en condition d'AA, la réponse métabolique à basse concentration d'O₂, médiée par le facteur HIF est activée. Ainsi, nous détectons une surexpression des gènes et enzymes cibles de HIF (*PGK1*, *OPA1*, *MTOR*, *NDRG1*, *TBL2*, *PSMC2*, *LONP1*, *SLC2A1*, *PSMC5*, *ENO1*, *P4HB*, *STUB1*, *UBQLN*, *THBS1*, *PSMB4*, *PML*, *PFKB3*, *ENO2*, *EIF4E2*, *HK2*, *IGF1R*, *INSR*, *PFKP*, *VEGFA*).

Dans le groupe de la respiration cellulaire (Figure 47B), nous avons observé une augmentation de l'expression des sous-unités du CI (*NDUFA13*, *NDUFB10*, *NDUFV1*, *NDUFA9*, *NDUFS3*), de la sous-unité 2 du cytochrome C oxidase du CIV (*MT-CO2*), et des enzymes du cycle de Krebs (*NNT*, *FAHD1*, *PDHB*, *CS*). De plus, tous les métabolites du cycle de Krebs, à l'exception du succinate et du pyruvate, sont diminués par rapport à 3 % d'O₂ et à l'anoxie, ce qui indique leur utilisation dans diverses réactions biochimiques.

Dans l'ensemble ces résultats indiquent que l'absence simultanée de glucose et d'O₂ induit la dégradation des sucres de réserve pour la production de pyruvate par la glycolyse, et l'activation mitochondriale du cycle de Krebs. De plus, de manière intéressante, des enzymes qui catalysent des réactions de réduction de la CoQ de la CRM, *CY5BR3* (comme dans la condition d'anoxie) et *SQOR*, enzyme de la première étape de la voie d'oxydation mitochondriale du H₂S, sont augmentées en AA par rapport à la condition physioxique. Ces enzymes sont présentes sur la membrane mitochondriale et permettent de fournir des électrons à la CoQ à partir du NADH pour *CYBR3* et du H₂S pour la *SQOR*.

Le maintien du potentiel de membrane et la présence des complexes de la CRM semblent important pour la survie des CStroM en AA. En lien avec l'augmentation du SQOR, nous avons observé l'augmentation des gènes et enzymes associés au métabolisme du GSH (*GSTO1/2*, *ANPEP*, *PRDX6*, *NNT*). Le GSH est impliqué dans le métabolisme de l'oxydation du H₂S (Figure 20). Il est important de noter qu'il existe une augmentation des enzymes modulant la fusion mitochondriale et impliquées dans le maintien de l'énergie mitochondriale et de la structure des crêtes (*VAT*, *OPA1*).

Les gènes et enzymes impliqués dans les processus métaboliques des acides aminés sont retrouvés significativement augmentés dans la condition d'AA (Figure 47B et Figure 61/Annexe/2, Figure 64/Annexe 5), notamment l'Asp/Asn (*ASNS*), la Ser (*PHGDH*, *PSAT1*), la Gln (*GFPT1*), la Cys (*PCYOX*), le Try (*WARS*) et l'Arg/Pro (*P4HB*, *PYCR1*, *CKB*, *OAT*, *PDXK*). Les enzymes *SAT1/2*, impliquées dans la formation d'ornithine à partir de spermine/spermidine sont retrouvées sous-exprimées, alors que l'enzyme impliquée dans la formation inverse de transformation de la putrescine en spermidine (*FAHD1*) est retrouvée sous-exprimée. L'ornithine est un intermédiaire important dans le métabolisme de dégradation des acides aminés, notamment le glutamate, permettant d'alimenter le cycle de Krebs ou encore la cystéine, essentiel dans le métabolisme des sulfides. Un autre acide aminé, la sérine est un intermédiaire important pour le métabolisme des sulfides. L'enzyme *PHGDH*, la première et la seule enzyme limitante dans la voie de biosynthèse de novo de la sérine, catalysant l'oxydation du 3PG dérivé de la glycolyse en 3-phosphohydroxypyruvate (3PHP), est retrouvée surexprimée, de même que l'enzyme catalysant l'étape suivante de transformation du 3PHP en 3Pser. De plus tous les acides aminés sont détectés à des niveaux considérablement diminués par rapport à la physioxie. Cela indique que dans la condition AA, l'utilisation des acides aminés comme source d'énergie est plus élevée.

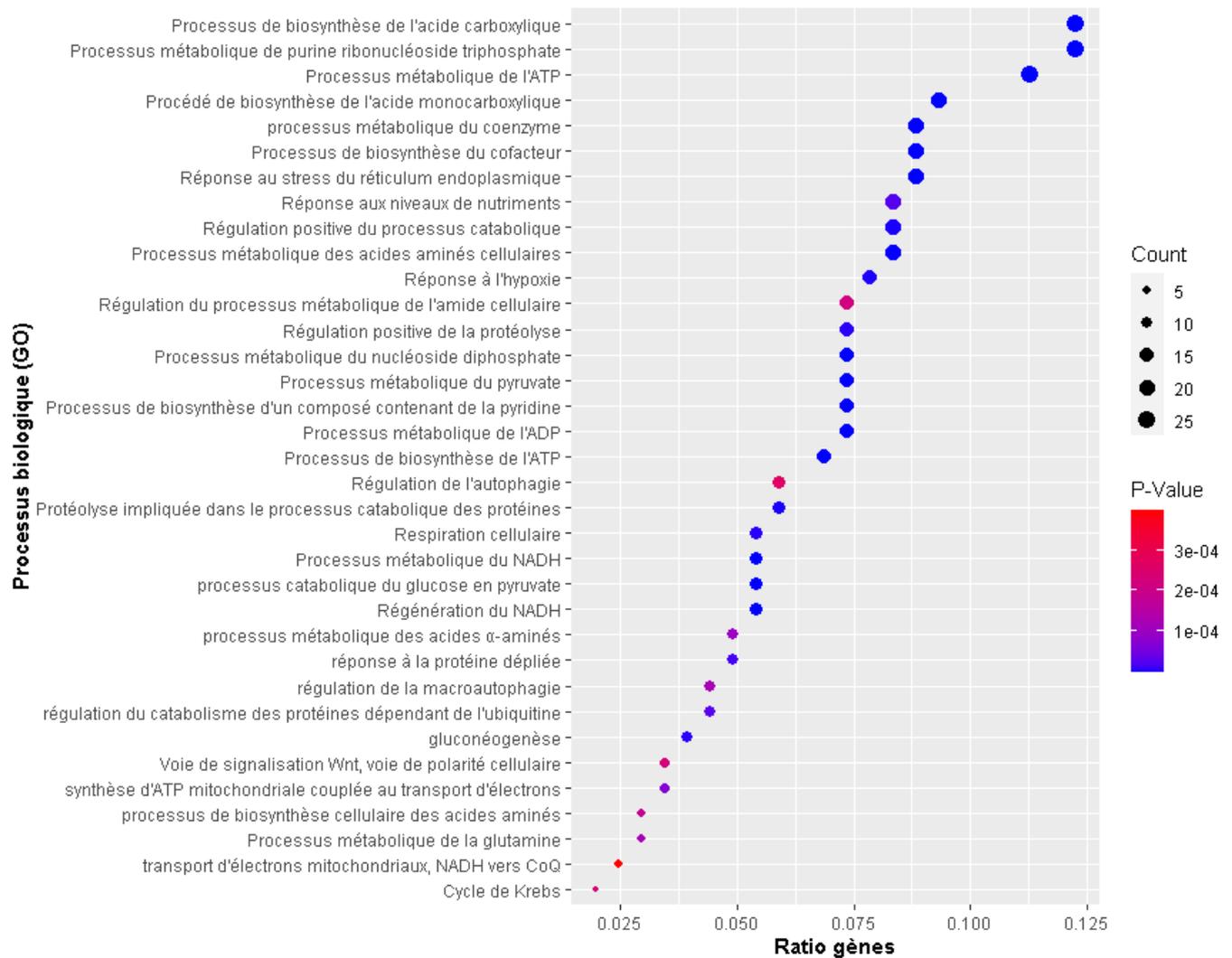
Une accumulation de métabolites de la voie des PP, le SED7P qui alimente le glycéraldéhyde3P cytoplasmique et le PRPP, critique pour la synthèse des nucléotides (NAD⁺/NADH et NADP⁺/NADPH), a été détectée dans la condition d'AA par rapport à la condition à 3% d'O₂. De la même manière qu'en anoxie, une augmentation des enzymes impliquées dans le métabolisme des nucléotides et la voie de sauvetage des nucléotides puriques (*ADSL*, *AK2/4*, *NUDT16*, *ASNS*) a été détectée dans la condition d'AA par rapport à la condition à 3% d'O₂.

La réduction de la *SPTLC2* indique une réduction de la synthèse des sphingolipides qui est un processus anabolisant consommateur d'énergie.

Dans la condition d'AA, il y a une activation des enzymes impliquées dans la réponse autophagique (*LAMTOR3*, *ATP6V1D*, *IFI16*, *MTOR*, *GAPDH*, *CDC37*, *STAT3*, *LARP1*, *SPTLC2*, *RAB5A*, *GNAI3*, *EIF4G2*) et la réponse au stress endoplasmique (*FAF2*, *OPA1*, *ASNS*, *RCN3*, *TBL2*, *FLOT1*, *GFPT1*, *BAG6*, *DDRGK1*, *MAN1B1*, *P4HB*, *STUB1*, *UBQLN1*, *THBS1*, *DNAJC3*, *DERL2*, *PML*, *UFL1*).

En conclusion, dans la condition AA, l'utilisation du sucre de réserve pour augmenter l'activité glycolytique et, dans certains aspects, le cycle de Krebs ainsi que le métabolisme des acides aminés sont stimulés par rapport à la physiologie.

A.



B.

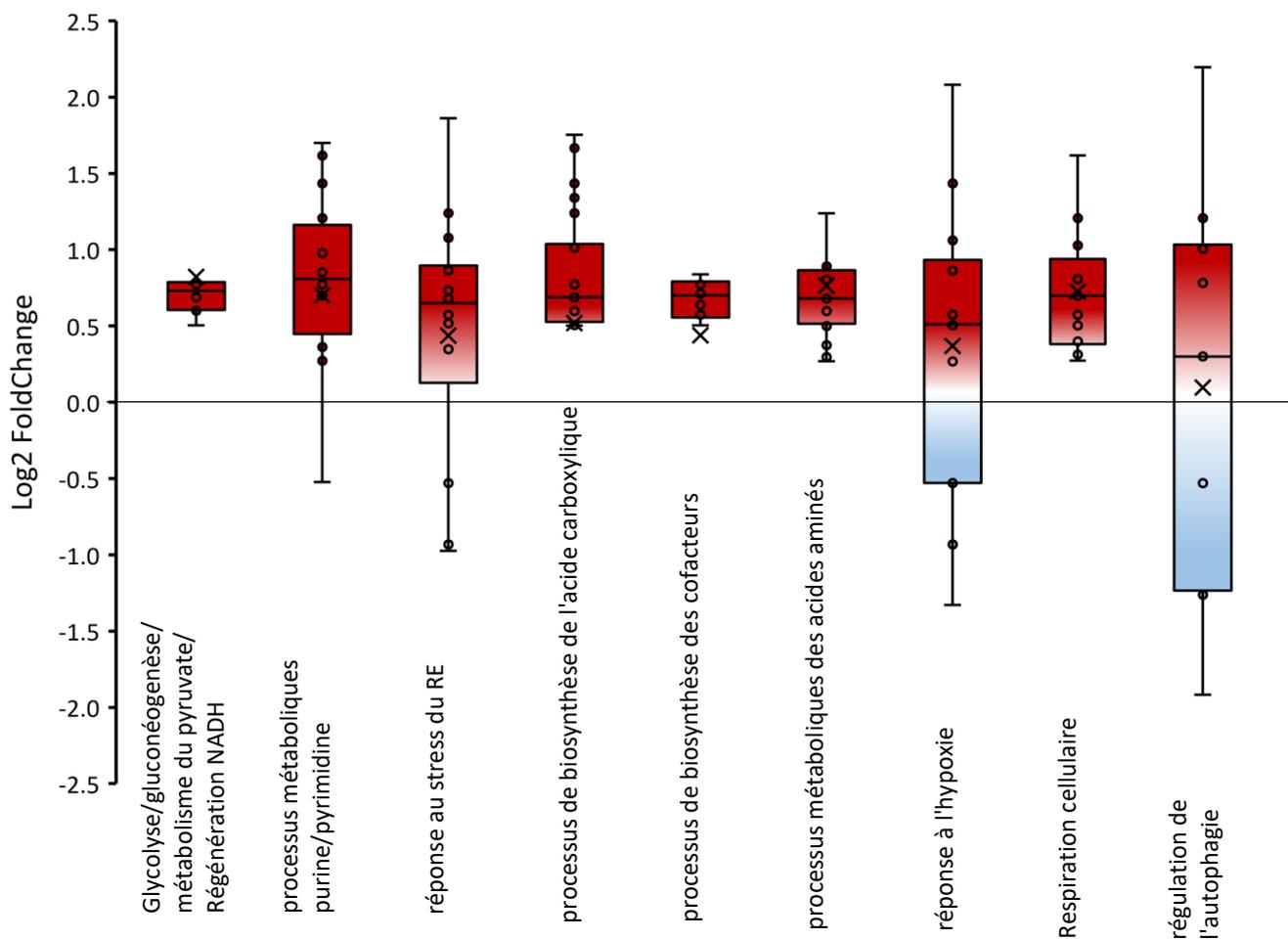


Figure 47. Analyses protéomiques des CStroM incubées pendant 5-7 jours en AA et à 3% d'O₂. A. Les résultats sont présentés sous forme de Dotplot d'enrichissement à partir de l'analyse fonctionnelle de classification clusterProfiler des processus biologiques à partir des catégories GO (« gene ontology) du logiciel ProteoRE. Chaque boule représente un processus biologique où la taille de la boule représente le nombre de protéines retrouvées différemment exprimées dans le protéome. Les processus biologiques sont classés en fonction du ratio des gènes trouvés différemment exprimés par rapport à la totalité des gènes appartenant à la catégorie GO. La P-value est représentée en dégradé de couleur ou elle représente la valeur de positivité de l'enrichissement par rapport au seuil ($p < 0,05$). B. Boîte à moustache représentant la surexpression et la sous expression des différentes protéines de différentes catégories de processus biologiques du Dotplot A. La valeur de l'expression protéique est calculée en log2FC compris entre 0,6 et -0,6.

Analyse transcriptomique, protéomique et métabolomique des CStroM issues des cultures en AA et en ANO

Notre analyse a mis en évidence que la survie des CStroM en absence de glucose et d'O₂ induit une reprogrammation métabolique basée sur une hausse d'activité mitochondriale par rapport à la condition en ANO, similaire, ou dépassant sur certains aspects (activité spécifique des enzymes du cycle de Krebs), celle détectée en physioxie (Figure 48, Figure 62/Annexe 3, Figure 65/Annexe 6). Pour pouvoir connaître les adaptations métaboliques menant à ces observations, nous avons analysé les voies biochimiques utilisées par les CStroM dans la condition d'absence simultanée de glucose et

d'oxygène en comparaison à la seule omission d'O₂. Nous avons détecté 163 protéines et 132 gènes différentiellement exprimés (Figure 62/Annexe 3, Figure 65/Annexe 6). Des changements significatifs sont détectés dans le niveau d'expression des enzymes du cycle de Krebs et de la CRM, l'oxydation des AG, le métabolisme des acides aminés et le métabolisme du H₂S.

L'analyse protéomique et transcriptomique a révélé l'augmentation particulière de l'expression de sous unités du CI de la CRM (NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFV1, NDUFA10, NDUFA5, NDUFA9, NDUFB10, NDUFB3, NDUFB4, NDUFB9, NDUFS4), ainsi que des sous unités du CIII (UQCRC1, UQCRC2), CIV (MT-CO2, COX5A, COX5B) et CV (ATP5PD). Ceci est associé avec une augmentation de l'expression d'enzymes du cycle de Krebs (DLST, IDH3A, IDH1, MDH2, OGDH, PDHB, *SUCLG2*) associées à l'expression et à l'organisation des gènes mitochondriaux (Figure 48B). Egalement, nous avons identifié une stimulation du métabolisme des acides lipoiques qui est un coenzyme des protéines impliquées dans le cycle de Krebs (OGDH, PDHB, DLST, FADH2), (Solmonson & DeBerardinis, 2018).

Dans l'ensemble ces résultats indiquent que l'omission de glucose en plus de l'O₂ induit une augmentation du métabolisme mitochondrial par rapport à l'anoxie où la glycolyse anaérobie est la principale voie de survie. Il est important de noter qu'entre les CStroM incubées en AA et en ANO il n'y a pas de différence concernant l'expression des enzymes glycolytiques sauf dans les réactions finales au niveau de l'expression de LDH qui est significativement augmentée en anoxie. La glycolyse est de ce fait un axe principal dans ces deux conditions, mais avec des aboutissements différents. Le pyruvate glycolytique en AA est donc destiné aux mitochondries, converti en acétylCoA par le PDH, pour alimenter le cycle de Krebs.

En AA, nous avons détecté une expression significativement augmentée de l'enzyme GPD2 mitochondriale et de son enzyme partenaire EFDH2. La GPD2 fait partie intégrante du système de la CRM et de la navette glycérophosphate (GP) reliant les mitochondries et les processus cytosoliques au carrefour entre la glycolyse, les OxPhos et le métabolisme des AG. Ces réactions jouent un rôle important dans la bioénergétique cellulaire, et le maintien de la balance de NAD/NADH tant dans des conditions physiologiques que pathologiques (S. Liu et al., 2021; Mráček et al., 2013). Sur la membrane mitochondriale, le G3P est oxydé, formant du DHAP. La paire d'électrons est transférée au FAD formant du FADH2 et ces deux électrons sont ensuite transférés à la CoQ qui devient réduite dans la membrane. Cette réaction est associée à la réaction catalysée par la GPD2 cytosolique qui effectue la réaction inverse en réduisant le DHAP en G3P couplée à une oxydation du NADH en NAD⁺. Cette navette a trois rôles métaboliques majeurs : la réoxydation du NADH cytosolique dans les cellules glycolytiques, le contournement du CI lors de l'oxydation cytosolique du NADH avec le transfert d'électrons à la CRM et la régulation du G3P cytosolique comme métabolite reliant la glycolyse, la lipogenèse et les OxPhos. Nous avons déjà montré qu'en AA l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme de la sérine est augmentée par rapport à la physioxie mais aussi par rapport à l'anoxie (PSAT, SHMT2,

SPTCL2). Cela suggère que l'utilisation du métabolisme de la sérine est une caractéristique spécifique de la condition mimant l'ischémie. Nous avons détecté la surexpression de l'enzyme SHMT2 qui convertit la sérine en glycine couplée au cycle des tétrahydrofolate pour former du N5, N10-méthylène-THF et, par la suite, du 5-méthyl-THF, un intermédiaire dans la méthylation de l'homocystéine et la méthionine. De plus, nous avons détecté la sous-expression d'un homologue de l'enzyme AHCYL1 du cycle de la méthionine qui catalyse l'hydrolyse de la SAH pour former de l'adénosine et de l'homocystéine. Il existe deux protéines de type AHCY, AHCYL1 et AHCYL2, qui ont perdu leurs fonctions enzymatiques canoniques en raison de mutations critiques. Cependant, via l'hétéromultimérisation, AHCYL1 et AHCYL2 peuvent supprimer l'activité enzymatique de l'AHCY et ainsi agir comme des régulateurs négatifs dominants de l'AHCY canonique (Devogelaere et al., 2008). Cette enzyme est retrouvée sous-exprimée en AA par rapport aux conditions d'ANO et de 3% d'O₂. L'enzyme MTAP, qui catalyse la phosphorylation réversible de la S-méthyl-5'-thioadénosine (MTA) en adénine et 5-méthylthioribose-1-phosphate, première étape de la voie de récupération de la méthionine après la génération du MTA à partir de la S-adénosylméthionine, est sous-exprimée en AA par rapport à l'anoxie. Cette sous-expression permettrait de rediriger le flux vers la formation d'homocystéine et de cystéine.

Cependant, il existe une augmentation de l'expression génique de la *GSTO1* et de certaines enzymes du métabolisme du glutathion (*LANCL1*, *GCLM*, *IDH1*, *PRDX6*) par rapport à l'anoxie. Nous avons déjà observé cette augmentation en AA par rapport à la physioxie. Cette augmentation des enzymes impliquées dans la formation de glutathion et de la sérine est à mettre en parallèle de la détection de l'implication du métabolisme des sulfides (Figure 48B). Si on regarde l'oxydation canonique des sulfides en tant que substrat énergétique inorganique, le H₂S pourrait être un donneur d'électrons pour la CRM. L'enzyme SQOR, surexprimée en AA non seulement par rapport à la condition ANO mais aussi la condition à 3% d'O₂, catalyse l'oxydation du H₂S en persulfide et transfère les électrons à la CoQ qui devient réduite. Ce persulfide est ensuite transféré au glutathion, formant du glutathion persulfide (GSSH) (Banerjee & Kumar, 2022; Filipovic et al., 2018). Dans cette voie (Figure 20), l'enzyme TST convertit le GSSH en présence de sulfite en thiosulfate. L'analyse omique a également révélé que l'enzyme TST est régulée positivement en AA, indiquant l'utilisation du H₂S comme donneur d'électrons en l'absence de glucose et d'O₂. Avec la mGAPDH, cette voie d'oxydation du H₂S permet de fournir des électrons à la CRM via une réduction de la CoQ, suggérant l'importance de la réduction de la CoQ comme étape critique pour le maintien et la survie des CStroM en AA.

De plus, dans l'AA, il y a une accumulation de succinate comme indiqué précédemment (J. Zhang et al., 2018) par rapport à l'anoxie (Figure 49 et Figure 66/Annexe 7). Le succinate a également été détecté par luminométrie (Figure 50), où nous avons observé une accumulation en AA par rapport à l'anoxie

et à 3% d'O₂. L'analyse protéomique a révélé que plusieurs voies, convergeant vers la production de succinate, sont stimulées dans la condition d'AA. C'est principalement la conséquence de l'expression stimulée de la *SUCLG2* qui catalyse la conversion de la succinyl CoA en succinate dans une réaction qui produit de l'énergie par une phosphorylation. Aussi, il existe une expression importante des enzymes impliquées dans le métabolisme de la proline (*ALDH18A1*, *ALDH2*, *CNDP2*, *PYCR1*). L'augmentation de l'expression de l'enzyme *PYCR1* qui convertit la proline en glutamate peut stimuler la réaction de conversion du glutamate en α -KG par la glutamate déshydrogénase. Celui-ci pourrait à son tour être converti en succinylCoA, un substrat pour la *SUCLG2*. L'alimentation des intermédiaires du cycle de Krebs peut aussi se faire par la β -oxydation. Des enzymes fournissant de l'acétylCoA pour l'alimentation du cycle de Krebs ou des corps cétoniques sont surexprimés (*ACADM*, *ALDH2*, *CPT2*, *ECHS1*, *GCDH*). L'oxydation des AG à nombre de carbones impair donne naissance au propionyl CoA qui est converti via une enzyme surexprimée dans la condition d'AA, la *MUT*, en succinyl CoA, qui entre dans le cycle de Krebs. De plus, l'enzyme *OXCT1* est augmentée dans cette condition. Cette enzyme clé du métabolisme des corps cétoniques permet la conversion réversible d'acétoacétate en acétoacétylCoA et la conversion réversible de succinylCoA en succinate.

Aussi, la *MDH2* réduit le malate en fumarate, qui à son tour pourrait être réduit en succinate par réaction inverse de la succinate déshydrogénase, comme démontré précédemment. En présence de pyrvinium pamoate, qui inhibe la fumarate réductase en condition ischémique (Tomitsuka et al., 2012), le nombre de CStroM après 5 jours de culture est en partie diminué (Figure 51A) indiquant que ce mécanisme est lié à la survie cellulaire des CStroM incubées en condition d'AA dans notre modèle.

De plus, le métabolisme des acides aminés est stimulé et fournit des métabolites des voies anapérotyques permettant le fonctionnement du cycle de Krebs. Ainsi, la surexpression de la *GCDH* peut convertir le glutaryl en crotonyl dans la voie de dégradation de la L-lysine, de la L-hydroxylysine et du L-tryptophane. Ces voies entraînent la conversion de l'acétoacétylCoA en acétylCoA par la thiolase et alimente le cycle de Krebs. De plus, la concentration de tous les acides aminés, à l'exception de la glycine et de l'aspartate, est diminuée par rapport à l'anoxie et à la physioxie, indiquant leur utilisation dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. En revanche, l'accumulation de glycine pourrait être liée au métabolisme stimulé de la sérine détecté dans les CStroM en AA (*SHMT2*). Cette enzyme fait partie du cycle des glyoxylates et dicarboxylates, utilisés par les bactéries, les champignons et les plantes pour convertir les AG en carbohydrates. Il se peut que ces enzymes (*SHMT2*, *MDH2*, *MMUT*) puissent, de la même manière que dans ces espèces, alimenter le cycle de Krebs.

A.

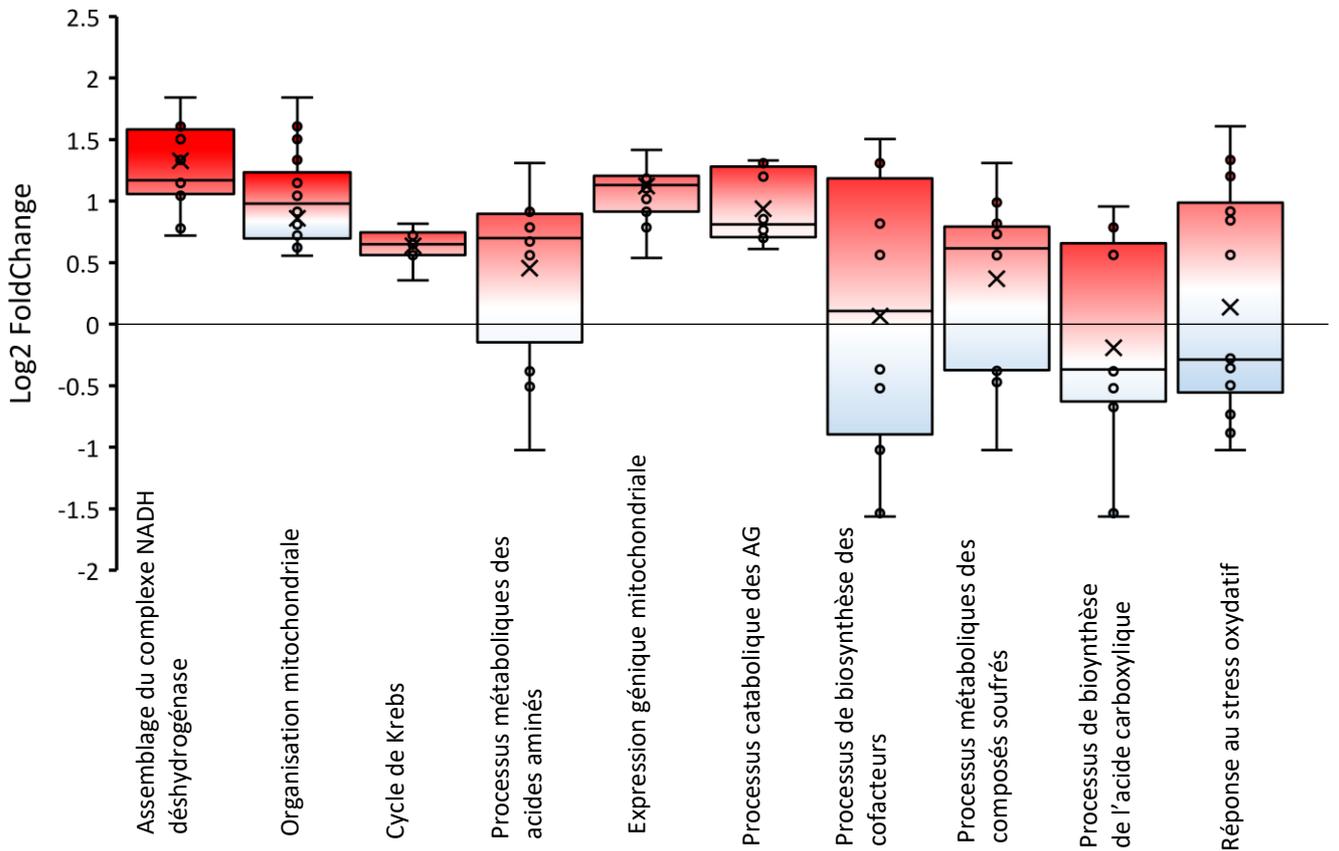
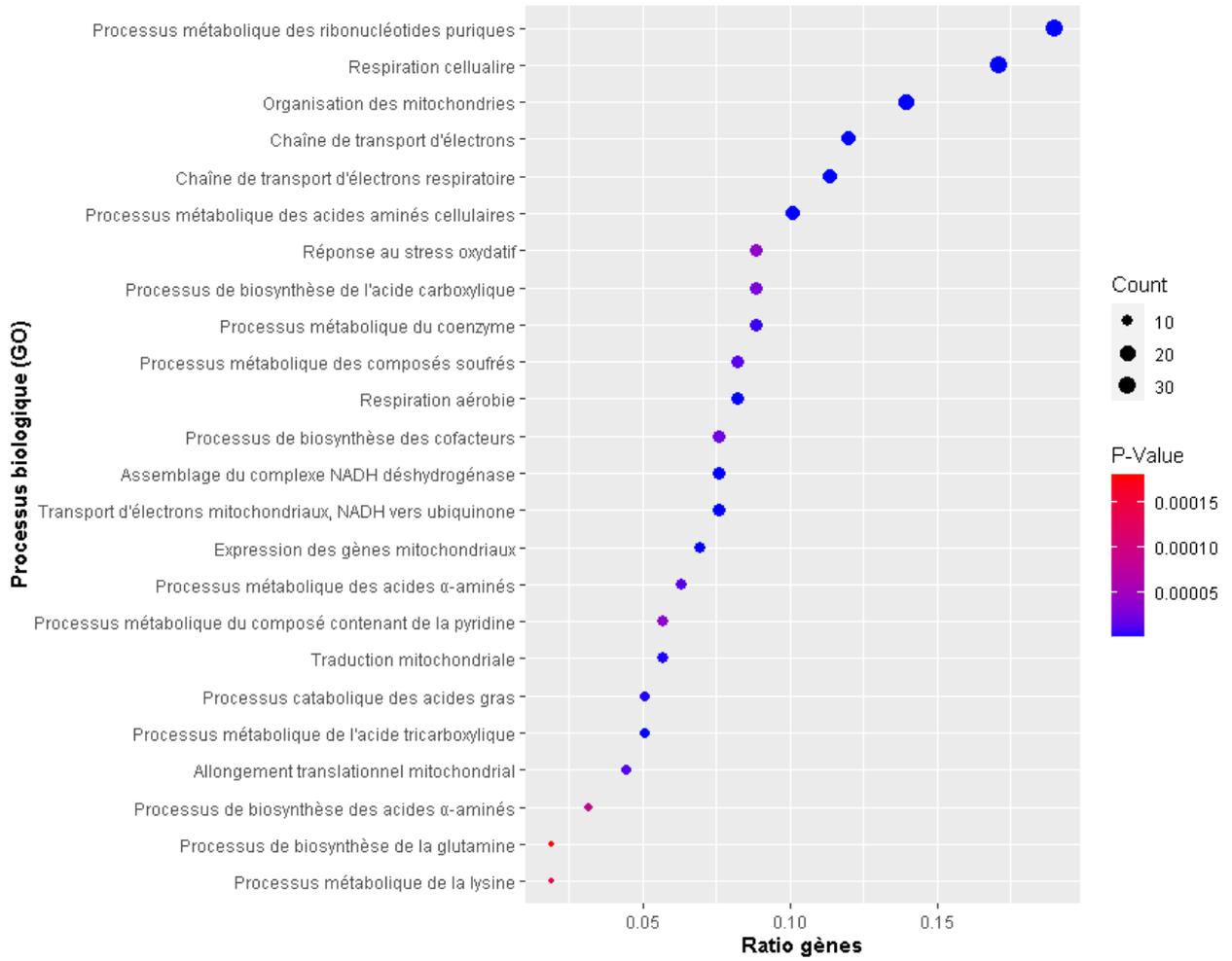


Figure 48. Analyses protéomiques des CStrom incubées pendant 5-7 jours en AA et en ANO. A. Les résultats sont présentés sous forme de Dotplot d'enrichissement à partir de l'analyse fonctionnelle de classification clusterProfiler des processus biologiques à partir des catégories GO (« gene ontology) du logiciel ProteoRE. Chaque boule représente un processus biologique où la taille de la boule représente le nombre de protéines retrouvées différemment exprimés dans le protéome. Les processus biologiques sont classés en fonction du ratio des gènes trouvés différemment exprimés par rapport à la totalité des gènes appartenant à la catégorie GO. La P-value est représentée en dégradé de couleur où elle représente la valeur de positivité de l'enrichissement par rapport au seuil ($p < 0,05$). B. Boite à moustache représentant la surexpression et la sous expression des différentes protéines de différentes catégories de processus biologiques du Dotplot A. La valeur de l'expression protéique est calculée en \log_2FC compris entre 0,6 et -0,6.

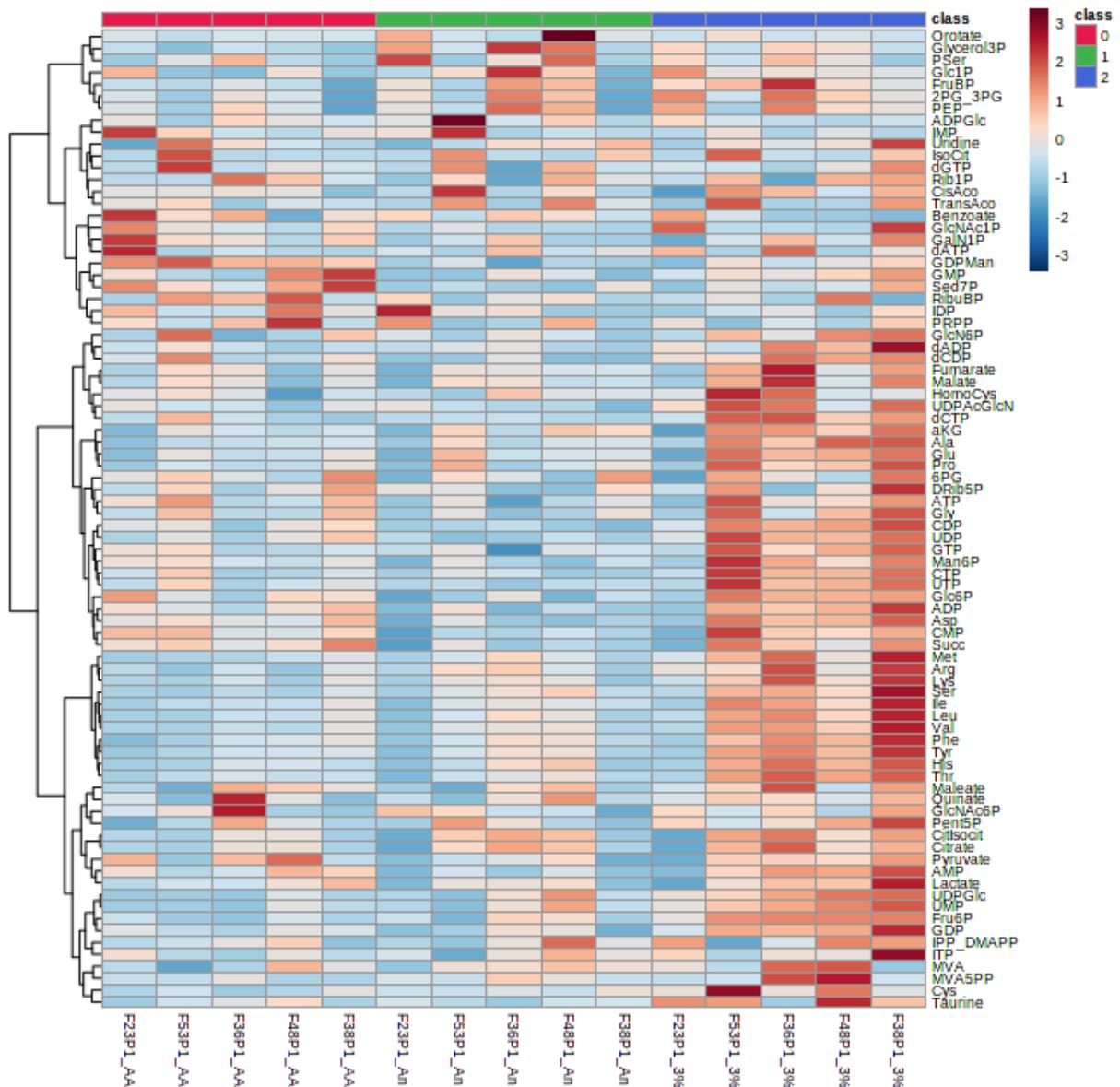


Figure 49. Analyses métabolomiques des CStrom incubées pendant 5-7 jours en AA, ANO et à 3% d'O₂. Les résultats sont présentés sous forme de heatmap comprenant 5 donneurs de CStrom par conditions (AA : F23P1_AA, F53P1_AA, F36P1_AA, F48P1_AA, F38P1_AA ; ANO : F23P1_An, F53P1_An, F36P1_An, F48P1_An, F38P1_An ; F23P1_3%O₂, F53P1_3%O₂, F36P1_3%O₂, F48P1_3%O₂, F38P1_3%O₂). La quantité a été déterminée par l'analyse métabolomique et chaque valeur a été normalisée par rapport au nombre et au volume des cellules issues des chaque conditions expérimentales.

APPRONFONDISSEMENT DES ANALYSES OMICS DES CStroM DE MO EN CONDITION MIMANT L'ISCHEMIE AA, EN ANOXIE ET A 3% D'O₂

Analyse de la quantité de succinate extracellulaire des CStroM issues de culture en AA, ANO et à 3% d'O₂

Pour tester si, dans nos conditions d'AA, le succinate qui s'accumule est dû aux différentes voies anaplérotiques mises en avant par les expériences d'OMICS, nous avons mesuré la quantité de succinate dans les surnageants de culture. Les résultats montrent que la teneur en succinate dans le surnageant en AA est significativement plus élevée que celle en ANO et à 3 % d'O₂ (Figure 50). Ces résultats indiquent clairement une accumulation de succinate dans des conditions de type ischémie et suggèrent l'activation des voies mitochondriales alimentant le cycle de Krebs et la respiration du fumarate en tant que voie énergétique, activant de ce fait la respiration mitochondriale anaérobie.

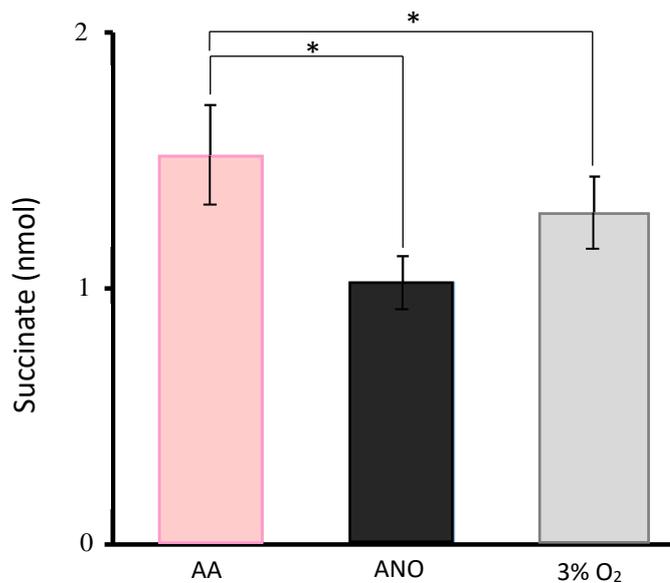


Figure 50. Quantité de succinate de CStroM incubées pendant 5 jours en AA, ANO et à 3% d'O₂. Les barres représentent la moyenne du niveau de succinate sécrété dans les milieux de culture \pm SM de 3 expériences indépendantes. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à $*p < 0,05$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Analyse de l'implication de la glycolyse et de la CRM sur la survie et la production d'ATP des CStroM issues des cultures en AA, en ANO et à 3% d'O₂

Pour pouvoir identifier en détail les voies biochimiques critiques pour la survie des cellules dans les voies d'AA et d'ANO, nous avons estimé la survie des CStroM en présence d'inhibiteurs de glycolyse

ou de la CRM présents tout au long de la culture dans les trois conditions expérimentales d'AA, d'ANO et à 3% d'O₂ (Figure 51A).

L'inhibition de la glycolyse a été réalisée en présence de 2DG, inhibiteur de la première enzyme impliquée dans la glycolyse, l'HK qui permet de convertir le glucose en G6P, ou d'oxamate, inhibiteur de la LDH, permettant la conversion de pyruvate en lactate (glycolyse anaérobie). La présence de ces inhibiteurs de glycolyse (2DG 1mM et oxamate 25mM) entraîne une chute de la capacité proliférative des CStroM en anoxie et à 3% d'O₂. Dans la condition AA, les CStroM ne semblent pas impactées par la présence de ces deux inhibiteurs. Ceci suggère que la survie en AA est moins associée avec l'activité glycolytique que les conditions ANO et 3% d'O₂.

Par la suite, nous avons également testé la prolifération en présence d'un inhibiteur de la gluconéogenèse, l'acide 3-mercaptopicolinique (3-MP). C'est un inhibiteur spécifique de l'enzyme PEPCK, qui catalyse la transformation d'OAA en PEP, deuxième étape de la gluconéogenèse. La prolifération des CStroM en anoxie est inhibée par la présence du 3-MP par rapport à la condition AA, suggérant une implication de la gluconéogenèse dans la survie et la prolifération des CStroM en anoxie.

De la même manière, l'implication des différents complexes de la CRM dans la survie des CStroM a été estimée. La roténone ou le pyrvinium pamoate (PiPa) ont été utilisés comme inhibiteurs du CI. En présence d'O₂, le PiPa active donc la CRM via le complexe II, malgré l'inhibition du complexe I. En revanche, dans des conditions microenvironnementales tumorales d'anoxie/ischémie, le PiPa inhibe le système NADH-fumarate réductase (activé réverse du CII), (Tomitsuka et al., 2012). Nos résultats montrent une diminution significative de la survie des CStroM à 3% d'O₂ et particulièrement en AA pour les inhibiteurs du CI. Les CStroM en Ano ne semblent pas affectées par l'inhibition du CI. Nous avons cependant remarqué dans cette condition, en Ano, une insensibilité des cellules au PiPa, mais une diminution de la prolifération des CStroM en présence de roténone, ce qui pourrait suggérer la nécessité de ce complexe en Ano autre que dans le transfert d'électrons à la chaîne respiratoire.

Le complexe II a été inhibé par l'action du malonate, inhibiteur compétitif de la succinate déshydrogénase (CII) et par la thényltrifluoroacétone (TTFA), qui bloque le site d'attachement du CoQ réduit au CII (E. Takahashi & Sato, 2014). L'utilisation de malonate n'affecte dans aucune des trois conditions ni à aucune concentration pas la survie et la prolifération des CStroM. La présence de TTFA, provoque une diminution significative de la survie en Ano et à 3% d'O₂ et de manière significativement moins importante en AA. L'antimycine est quant à lui un inhibiteur du CIII. Nous n'avons pas observé de différence significative après utilisation d'antimycine (0,2 µM) entre les différentes conditions. Cependant, une concentration plus importante d'antimycine entraîne une réduction très importante de la survie des CStroM dans la condition d'AA. Il est possible que de fortes concentrations

d'antimycine entraîne l'inhibition d'autres enzymes critiques pour la survie de ces cellules dans la condition d'AA ([Theissen & Martin, 2008](#)).

Les mêmes analyses ont été ensuite effectuées en mesurant le contenu en ATP total des CStroM dans les différentes conditions expérimentales. Les résultats présentés dans la Figure 51B montrent le pourcentage d'inhibition d'ATP en fonction de différents inhibiteurs présentés pour la figure précédente. Le pourcentage d'inhibition représente la différence entre le pourcentage d'ATP basal et le pourcentage d'ATP mesuré en présence d'inhibiteurs. En présence de 2DG, le pourcentage d'inhibition le plus élevé est détecté dans la condition d'Ano par rapport à la condition d'AA et à 3% d'O₂, montrant que la production d'ATP est majoritairement assurée par la glycolyse dans les CStroM cultivés en anoxie. Au contraire, l'inhibition de la production d'ATP par les mitochondries en présence d'oligomycine (inhibiteur d'ATP synthase mitochondriale) montre qu'en AA l'ATP est associé avec l'activité de l'ATP synthase de manière plus importante que dans les autres conditions. De plus, un pourcentage d'inhibition de la production d'ATP plus élevé en présence de roténone, antimycine ou PiPa détecté en AA par rapport aux autres conditions indique que l'activité de la CRM contribue à cette production d'ATP mitochondriale.

La présence de mitochondries polarisées et fonctionnelles est indispensable à la survie cellulaire. En effet, la présence du potentiel mitochondrial est indispensable au maintien des cellules, qui déclenchent les mécanismes d'apoptose et nécrose en cas de dépolarisation mitochondriale. Pour déterminer quelle partie du potentiel est fournie par le transport d'électrons par rapport à l'hydrolyse de l'ATP glycolytique, la roténone, l'antimycine, l'azide de sodium et l'oligomycine ont été utilisés pour dissiper le composant généré par la CRM. De l'autre côté, le 2DG a été utilisé pour dissiper le composant généré par la glycolyse. Ces inhibitions sont suivies d'une quantification de la polarisation mitochondriale par un marquage au TMRM et une analyse par cytométrie en flux. En Ano, le potentiel membranaire est dissipé de manière significative par rapport à l'AA en présence de 2DG. De plus, l'azide inhibe l'activité hydrolase de l'ATP synthase ([Bowler et al., 2006](#)), et son utilisation dissipe également le potentiel de membrane de manière significative en Ano par rapport à l'AA. Ceci accentue l'importance du maintien du potentiel membranaire mitochondrial en Ano. En AA, la plus forte dissipation du potentiel de membrane est mesurée en présence de roténone ou d'antimycine. Le potentiel n'est pas sensible à l'inhibition de la glycolyse par le 2DG dans la condition d'AA par rapport à l'Ano. Dans la condition d'Ano le potentiel de membrane est maintenu par l'hydrolyse de l'ATP glycolytique par l'ATP synthase. L'oligomycine mène à une hyperpolarisation des mitochondries qui est un résultat attendu du blocage du transfert des électrons de l'ATP synthase par cette molécule.

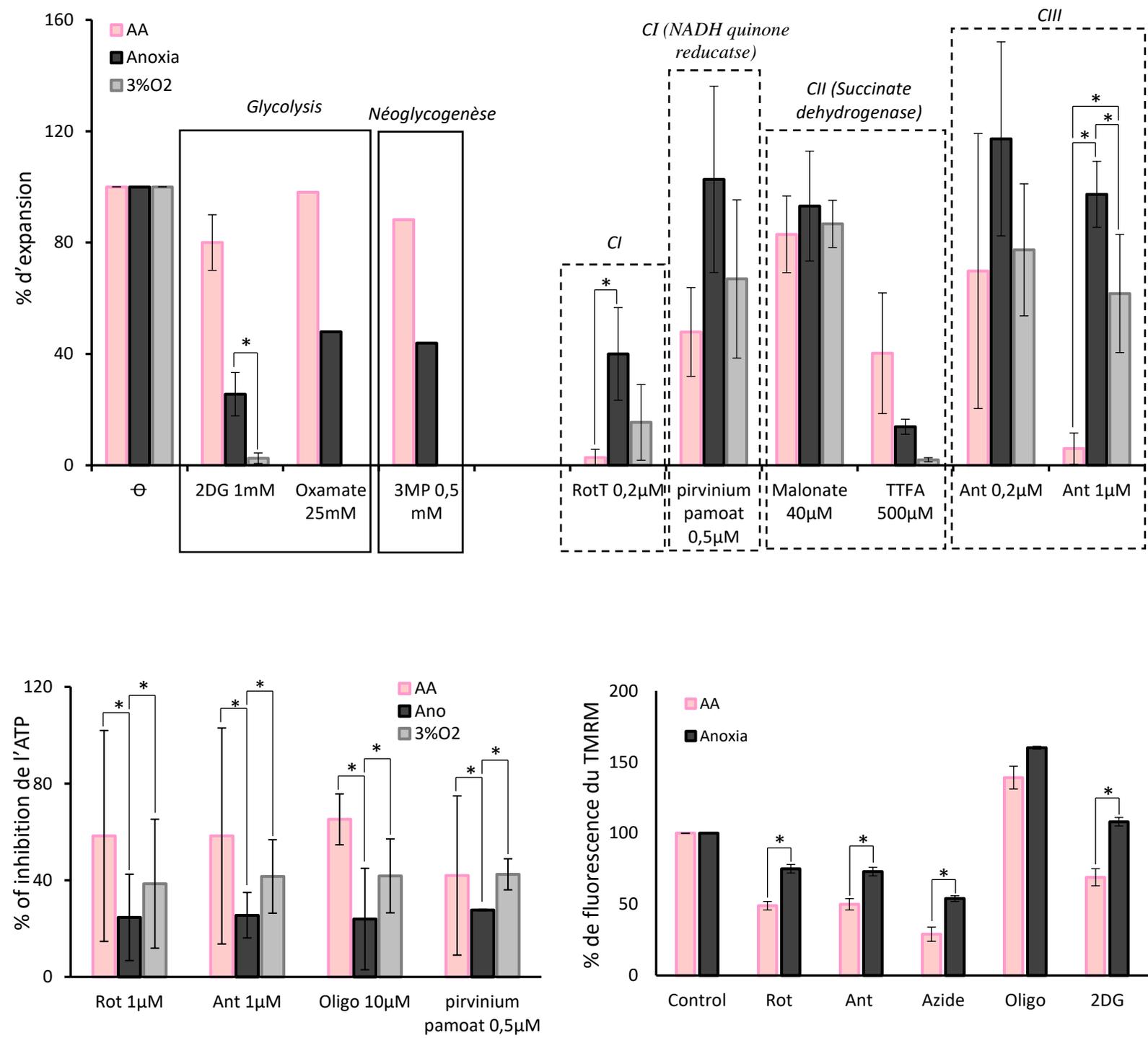


Figure 51. Prolifération, pourcentage d'inhibition de l'ATP et intensité de fluorescence du TMRM des CStrom de MO en AA, ANO et à 3% d'O₂ incubées pendant 4-5 jours en présence d'inhibiteurs métaboliques spécifiques. A. Les barres représentent le pourcentage moyen ± ES d'amplification de CStrom incubées 4 à 5 jours en AA, ANO et à 3 % d'O₂, de 1 à 8 expériences. B. Les barres représentent le pourcentage moyen ± EM d'inhibition du contenu en ATP de CStrom incubées 4 à 5 jours en AA, ANO et à 3 % d'O₂, de 3 à 4 expériences. C. Le potentiel de membrane mitochondriale mesuré à l'aide de la sonde TMRM en fonction des différents inhibiteurs métaboliques. Les barres représentent le pourcentage de fluorescence du TMRM. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à **p* < 0,05, test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Analyse de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale des CStroM issues des cultures en AA, en ANO et à 3% d'O₂

L'analyse transcriptomique et protéomique a révélé une forte surexpression des sous unités du CI en AA (13) par rapport à l'anoxie et (3) par rapport à 3% d'O₂. Nous avons estimé l'activité du CI afin d'étudier la surexpression des sous-unités (Figure 52A) et voir si elle était corrélée avec son activité (Figure 52B). L'estimation de l'activité du complexe I a été estimée après 4 jours de culture dans les trois conditions expérimentales. Ces résultats montrent une hausse significative de l'activité du complexe I dans les CStroM issu de la condition d'AA et d'ANO par rapport à 3% d'O₂.

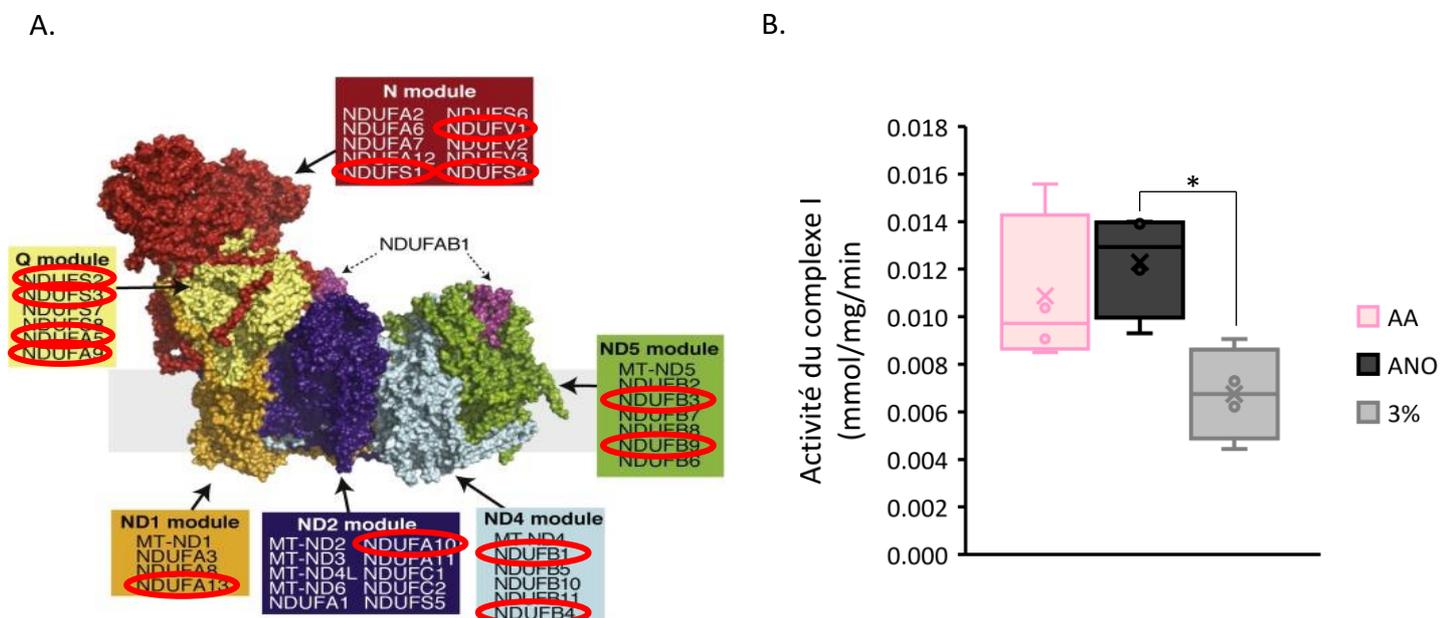


Figure 52. Détermination de l'activité du CI de la CRM de CStroM incubées en AA, ANO et à 3% d'O₂. A. Schéma représentatif des différentes sous unités retrouvées surexprimées dans les analyses OMICS entre l'AA et les deux autres conditions expérimentales d'ANO et de 3% d'O₂. Le schéma adapté de (Stroud et al., 2016). B. L'activité enzymatique du CI respiratoire mitochondrial a été quantifiée dans des fractions mitochondriales isolées de cultures de CStroM en AA, ANO et à 3% d'O₂, incubées pendant 4 jours. Toutes les valeurs sont présentées sous forme de points et de moyenne ± EM. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à * $p < 0,05$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Analyse de la quantité de NAD⁺ et NADH des CStroM issues des cultures en AA, en ANO et à 3% d'O₂

Les résultats d'activité du CI sont en cohérence avec la mesure du ratio NAD⁺/NADH que nous avons estimé par luminométrie. En effet dans la condition d'AA, la production de NAD⁺ est significativement plus élevée que dans les deux autres conditions, ce qui peut refléter une utilisation plus importante d'oxydation du NADH au niveau du CI de la CRM.

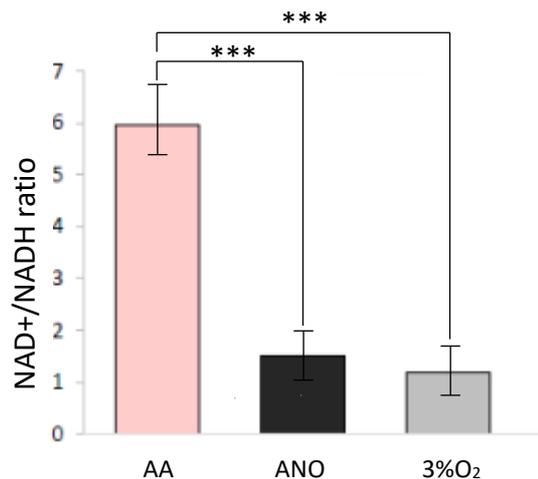


Figure 53. Analyse du rapport NAD⁺/NADH de CStroM incubées en AA, ANO et à 3% d'O₂. Le rapport est calculé par leur concentration respective dans les CStroM obtenues après 4 jours de culture dans les 3 conditions expérimentales (AA, ANO et 3% d'O₂). Nombre de donneurs = 3. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à *** $p < 0,001$, test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Dans l'ensemble ces résultats confirment que le profil énergétique en condition AA est basé sur l'activité de CRM et particulièrement du CI, alors que la survie en anoxie est associée avec la glycolyse et la gluconéogenèse.

IMPLICATION DU METABOLISME DES SULFIDES DANS DES CStroM DE MO EN CONDITION MIMANT L'ISCHEMIE (AA), EN ANOXIE ET A 3% D'O₂

Analyse de l'utilisation des sulfides (H₂S) et des acteurs du métabolisme des sulfides dans des CStroM issues des cultures en AA, ANO et à 3% d'O₂

L'ensemble des analyses « omics » (gènes, protéines et métabolites) a permis de mettre en évidence des gènes et des protéines impliqués dans le métabolisme des sulfides, significativement surexprimés dans les CStroM issues de la condition AA par rapport aux conditions d'Ano et de 3% d'O₂ (Figure 47, 48 et Figure 64/Annexe 5, Figure 65/Annexe 6). Des études protéomiques on observe l'augmentation de deux enzymes impliquées dans la voie catabolique du H₂S, la SQOR et la TST (Figure 54A). Ces deux enzymes permettent le transfert des électrons du H₂S à la CRM et la détoxification des produits de cette réaction (Figure 20). La surexpression de ces deux enzymes dans la condition AA par rapport aux deux autres conditions a été également confirmée par Western Blot (Figure 54B). Pour tester si ces observations sont associées avec une production/consommation modifié du H₂S, nous avons détecté la teneur en H₂S cellulaire en culture dans les trois conditions expérimentales.

Ainsi, le H₂S produit et relargué dans l'atmosphère de culture, est détecté par le noircissement d'un papier acétate déposé dans le bouchon de la flasque pendant toute la durée de culture. Ce papier est un papier filtre imprégné d'acétate de plomb. Il réagit avec le sulfure d'hydrogène en changeant de couleur du blanc au brun-noir. L'acétate de plomb réagit avec le sulfure d'hydrogène pour produire du sulfure de plomb noir. Cette mesure montre une augmentation du noircissement marquante de la teneur en H₂S en Ano par rapport à 3% d'O₂ et l'AA (Figure 54C). De plus, dans ces deux dernières conditions le noircissement était très faible et particulièrement dans la condition AA où le papier est resté quasiment blanc.

Ces résultats ont été affinés par la détection du H₂S intracellulaire par immunofluorescence en utilisant la sonde MeRho-Az. La teneur de H₂S intracellulaire est proportionnelle à l'intensité de la fluorescence du MeRho-Az. Cette étude a montré que l'intensité de la fluorescence est augmentée en ANO de façon marquante et est significativement réduite à 3% d'O₂ et notamment en AA (Figure 54D). La combinaison de ces résultats révèle une production et une accumulation d'H₂S en Ano. Par contraste le H₂S est consommé dans la condition à 3% d'O₂ et particulièrement en AA.

Dans la but de confirmer que le sulfide est impliqué dans la survie des CStroM en condition d'AA, nous avons cultivés les cellules en présence d'un donneur de sulfide, le morpholin-4-ium 4 methoxyphényl(morpholino)phosphinodithioate (GY4137). Ce composé soluble dans l'eau libère lentement du H₂S sur une période de plusieurs heures (L. Li et al., 2008). Cette étude montre une

hausse significative de l'expansion de CStroM en condition d'AA. Par contre, l'ajout de donneur n'a pas donné d'effet dans les deux autres conditions expérimentales. De plus, des travaux précédant ont révélé que la présence d'antimycine, en concentration élevée, inhibe le transfert d'électrons du SQOR vers le CoQ. Ce mécanisme est intégré dans le transfert d'électrons du H₂S vers la CRM, permettant son utilisation comme substrat énergétique. Dans notre modèle, la présence d'antimycine (1µM) a provoqué une forte mortalité des CStroM dans la condition d'AA et une légère baisse de l'expansion à 3% d'O₂ (Figure 54E). Au contraire, en condition d'Ano les cellules restent insensibles.

Ces résultats suggèrent que le H₂S est critique pour la survie des CStroM dans des cultures sans oxygène et sans glucose.

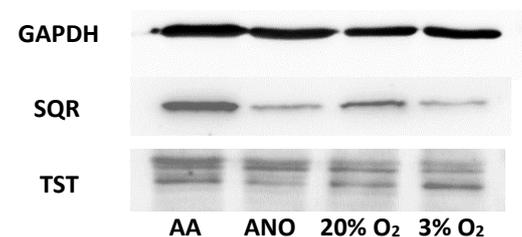
Il s'est alors posé la question du recyclage du H₂S sans oxygène. Le transcriptome a révélé en AA une augmentation de l'expression de trois gènes impliqués dans les réactions dépendantes du glutathion (Figure 54A). Nous avons émis l'hypothèse que le H₂S, en fonction de ses propriétés énergétiques, pouvait être utilisé dans des conditions ischémiques comme donneur d'électrons et être recyclé avec le glutathion par la glutathion-S-transferase, comme déjà montré précédemment (Z. Chen et al., 2018; Luna-Sánchez et al., 2017). Pour cela, le contenu en glutathion oxydé (GSSG) et réduit (GSH) a été évalué par luminométrie (Figure 54F et G). Nous avons constaté une augmentation de GSSG (Figure 54G) qui provoque une diminution du ratio GSH/GSSG en AA (Figure 54F), significative par rapport à la condition à 3% d'O₂, qui est due à une oxydation plus importante du GSH en AA par rapport à l'anoxie ou à 3% d'O₂.

A.

OMICS	VOIE	AA vs ANO	AA vs 3% O ₂
Gènes	Voie du glutathion	<i>GSTO1</i>	<i>GSTO1</i> ; <i>GSTO</i> ; <i>PRDX6</i>
Enzymes	Oxydation du H ₂ S	SQOR ; TST ;	SQOR
	Glutathion	PRDX6	GCLM
	Dégradation des acides aminés		AHCYL1
Métabolites	Dégradation des AA	CYS ;SER ; TAU	CYS ; SER ; TAU

B.

Expression de la protéine SQR



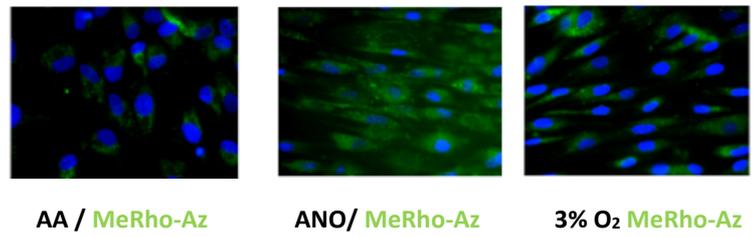
C.

Contenu de la culture en H₂S



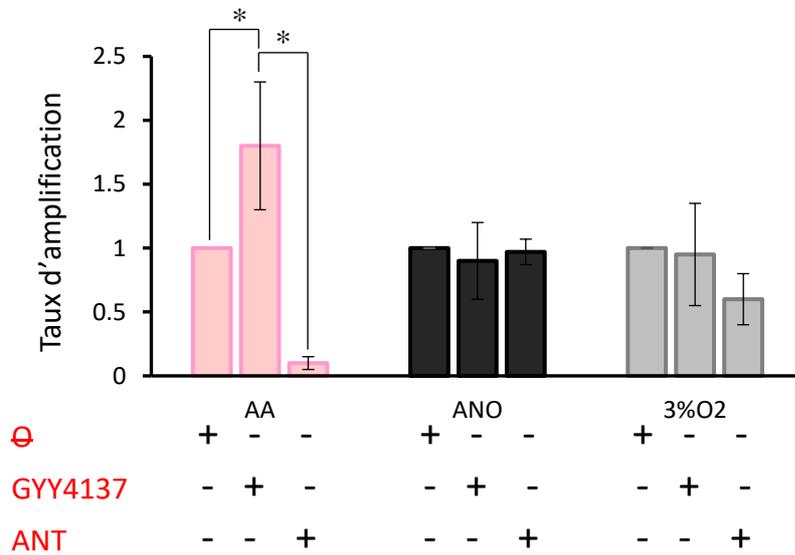
D.

Contenu intracellulaire en H₂S



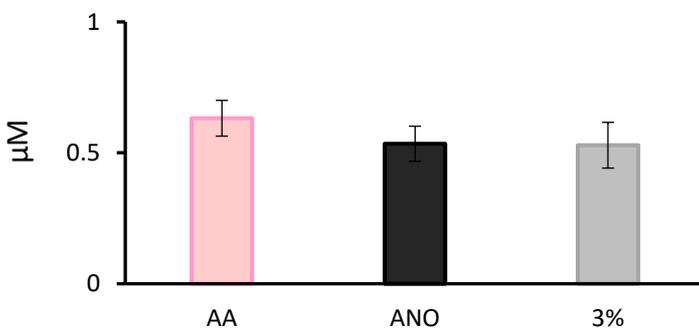
E.

Prolifération des CStroM en présence de H₂S (GY4137)



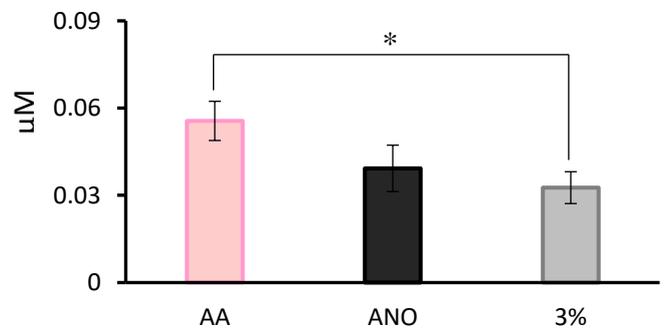
F.

GSH



G.

GSSG



H.

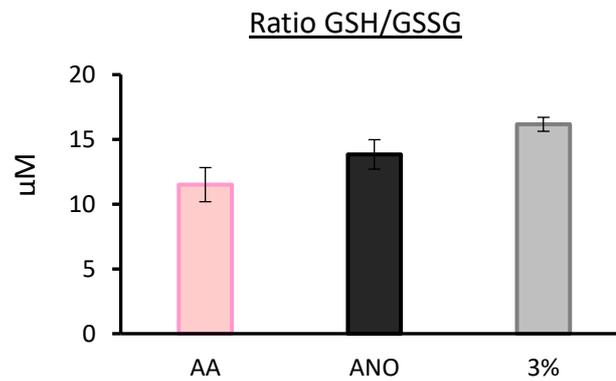


Figure 54. Analyse de l'implication du métabolisme du H₂S dans les CStrom incubées pendant 5-7 jours en AA, ANO et à 3% d'O₂. A. Tableau des gènes, enzymes et métabolites détectés comme différentiellement exprimés en AA vs ANO et AA vs 3% d'O₂, associés avec le métabolisme des sulfides. B. Analyse par Western Blot de l'expression des enzymes SQOR et TST dans des CStrom après 4 jours de culture dans les 3 conditions expérimentales (AA, ANO et 3% d'O₂). Protéine contrôle = GAPDH (35.9 kDa). Cette image est représentative de 3 expériences différentes. C. Teneur en H₂S de l'atmosphère de culture. Image représentative de réaction papier acétate de plomb (II) après 4 jours de culture de CStrom dans les 3 conditions expérimentales (AA, ANO et 3% d'O₂). D. Images de microscope à fluorescence du contenu intracellulaire en H₂S dans des CStrom après 4 jours de culture dans les 3 conditions expérimentales (AA, ANO et 3% d'O₂). Le H₂S est mis en évidence grâce à une sonde MeRho-Az (vert) et les noyaux sont colorés au Dapi (bleu). E. Taux d'expansion de CStrom après 4 jours de culture dans les 3 conditions expérimentales (AA, ANO et 3% d'O₂) en présence (50nM) ou en absence de donneur de H₂S : GYY4137. F. G. Glutathion réduit (GSH) calculé par leur concentration respective dans les CStrom obtenues après 4 jours de culture dans les 3 conditions expérimentales (AA, ANO et 3% d'O₂). Nombre de donneurs = 3. G. Glutathion oxydé (GSSG) calculé par leur concentration respective dans les CStrom obtenues après 4 jours de culture dans les 3 conditions expérimentales (AA, ANO et 3% d'O₂). Nombre de donneurs = 3. H. Rapport glutathion réduit/oxydé (GSH/GSSG) calculé par leur concentration respective dans les CStrom obtenues après 4 jours de culture dans les 3 conditions expérimentales (AA, ANO et 3% d'O₂). Nombre de donneurs = 3. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à *p < 0,05, test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

METABOLISME DES CD34⁺ DE MO EN CONDITION MIMANT L'ISCHEMIE AA, EN ANOXIE ET A 3% D'O₂

Analyses préliminaires de la survie et du profil bioénergétiques des CD34⁺ en AA, en ANO et à 3% d'O₂

Les cellules hématopoïétiques CD34⁺ sont une population, à l'image des CStrom, comprenant une majorité de cellules progénitrices et de rare CSH.

En ce qui concerne la survie et le profil bioénergétique des cellules CD34⁺ dans des conditions d'Ano et d'AA, certaines analyses ont été effectuées durant mon stage de master 2 et sont détaillées dans l'introduction de cette thèse et dans notre article publié dans *Frontiers in Oncology* en 2020 et intitulé « Normal Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Can Exhibit Metabolic Flexibility Similar to Cancer Cells » (Annexe ; [Vlaski-Lafarge et al., 2020](#)) où nous avons testé l'universalité des adaptations métaboliques mises en évidence chez les CStrom. Dans cet article, nous avons confirmé l'hypothèse que des CS humaines peuvent se comporter comme des cellules cancéreuses et survivre dans des conditions extrêmes telles que l'anoxie ou l'ischémie. La survie des cellules cancéreuses n'est, en fait,

pas spécifique du caractère tumoral des cellules mais est une caractéristique du potentiel souche des cellules cancéreuses (CSC).

Dans cet article, se basant sur le fait que les CSC présentent des caractéristiques métaboliques communes aux CS normales, une population CD34⁺ avec une majorité de progéniteurs hématopoïétiques et une population CD34⁺CD38^{low}CD133⁺CD90⁺CD45RA⁻ hautement enrichie en CSH ont été cultivées en condition d'AA, d'Ano ou physiologiques (3% O₂).

Les résultats d'expansion de ces deux populations cellulaires ainsi que la mortalité et le cycle cellulaire révèlent que les cellules CD34⁺ en Ano s'amplifient légèrement de manière significative dans la population enrichie en CSH et sont maintenues en AA. Ceci n'étant pas dû à une augmentation significative de la mort cellulaire mais plutôt à une accumulation significative des cellules incubées dans les conditions restreintes dans les phases quiescentes G0/G1 du cycle cellulaire. De plus, les cellules incubées en anoxie et en AA présentent une capacité de reconstitution de l'hématopoïèse similaire à celle observée dans la condition physioxique. Ces résultats indiquent une capacité de reconstitution à long terme maintenue par la population de CS, tout au long de l'incubation, ce trait étant attribuable aux CSH les plus primitives.

De la même manière que pour les CStroM, nous avons analysé certains paramètres du profil bioénergétique permettant la survie des cellules hématopoïétiques dans la condition d'anoxie et la condition mimant l'ischémie. La teneur en ATP cellulaire (Figure article 4A) a montré une diminution significative du niveau total d'ATP en Ano et AA par rapport à 3 % d'O₂, indiquant une diminution de la production cellulaire d'ATP. Après introduction simultanée d'inhibiteurs des complexes mitochondriaux I et III (respectivement roténone et antimycine), la diminution de l'ATP total indique la fraction d'ATP produite par les mitochondries. Nous avons constaté que la majeure partie de l'ATP des AA est produite par les mitochondries. Nous avons trouvé une quantité similaire de mitochondries actives dans toutes les conditions. Cela suggère que le contenu mitochondrial n'est pas affecté par l'absence d'O₂ ou de glucose. En Ano, même si l'ATP ne semble pas provenir de l'activité mitochondriale, celles-ci sont bien présentes et actives pour maintenir un potentiel de membrane nécessaire à la survie cellulaire.

Le succinate, un marqueur spécifique des cellules en ischémie, est utilisé comme substrat principal dans le système démontré par Eriko Tomitsuka de la FRD (Tomitsuka et al., 2010). Le succinate a été mesuré dans les surnageants de culture et les résultats montrent que la teneur en succinate dans le surnageant AA est significativement plus élevée que celle à 3 % d'O₂ et en Ano (Figure 4C article annexe(Vlaski-Lafarge et al., 2020)).

Dans l'ensemble le profil bioénergétique détecté dans les cellules CD34⁺ montre une activation de la mitochondrie permettant une production d'ATP de manière anaérobie par des voies impliquant la production et l'accumulation de succinate.

Ces résultats montrent un profil similaire entre les CStrom et les cellules hématopoïétiques CD34⁺.

Analyse de l'utilisation de métabolites au cours du temps par les CD34⁺ cultivées en AA, en ANO et à 3% d'O₂

La technologie Omnilog permet d'analyser la capacité des cellules à utiliser des composés énergétiques, i.e. de nombreux substrats peuvent être testés en parallèle dans des plaques 96 puits, où chaque puit est coâté avec un substrat spécifique. L'utilisation des substrats est proportionnelle à la réduction d'un colorant rédox, le sel de tétrazolium. Le métabolisme des cellules à partir du substrat utilisé dans le puit produit du coenzyme NADH, donneur d'électrons. Le colorant tétrazolium a un potentiel redox apte à accepter ces électrons et est irréversiblement réduit en formazan violet détectable par absorbance. Le colorant peut fonctionner indépendamment ou non de la structure spécifique de la CRM et a donc une application générale.

Nous avons utilisé deux types de plaques la « Biolog Phenotype MicroArrays » (PM-M1 ; Figure 33) et la « MitoPlates » (S-1 ; Figure 34). Pour effectuer le test, les cellules sont incubées dans un fluide d'inoculation (IF-M1 ou MAS) déficient en sources d'énergie. Ces plaques ont pu être scellées dans des sacs hermétiques permettant de maintenir la concentration d'O₂ constante tout au long de la lecture de plaques.

En utilisant la plaque PM-M1, la mesure se fait sur des cellules intactes et nous pouvons détecter une gamme de diverses sources de carbone, notamment des sucres simples (mono- et di-saccharides), des polysaccharides et des acides carboxyliques (plan de plaque en annexe). L'utilisation de sucres simples ou polysaccharides n'est pas adapté à la condition expérimentales d'AA. Nous avons donc effectué ce test sur les cellules en Ano et à 3% d'O₂. Les résultats de cette analyse sont présentés dans les figures 55, 56 et 57.

De manière générale, les sucres sont les métabolites les plus utilisés dans les deux conditions. Les sucres simples sont des substrats plus utilisés au cours du temps (19h au total) en Ano qu'à 3% d'O₂. Parmi des sucres simples, le glucose, le mannose, le tagatose et le cellobiose produisent une réaction colorimétrique plus intense en Ano qu'à 3% d'O₂, reflétant de l'utilisation intensive de la glycolyse dans cette condition (Figure 55). Il est intéressant de noter l'allure des courbes entre les deux conditions expérimentales. Les courbes dans la condition d'Ano semblent toutes atteindre un plateau avec un

maximum atteint aux alentours des cinq premières heures pour le glucose, le mannose, le turanose et le maltose. Dans la condition physiologique, pour ces oses simples, les courbes sont encore dans la phase exponentielle après 19h de réaction. Les cellules en Ano ont utilisé la totalité des sucres présents dans les puits avec une glycolyse très active qui leur fournit l'énergie nécessaire à leur survie et leur expansion (Figure 1 de l'article en Annexe (Vlaski-Lafarge et al., 2020)). A 3% d'O₂, les cellules utilisent les sucres de manière moins intensive. La glycolyse couplée aux oxydations phosphorylantes permet de fournir 16 fois plus d'ATP que la glycolyse seule. Leur besoin de consommer des substrats est donc moindre comparé à la condition d'Ano. Les principaux substrats utilisés par les CD34⁺ en condition d'Ano sont des oses simples qui peuvent directement donner du glucose pour alimenter la voie de la glycolyse ou bien être transformés en intermédiaires de cette dernière. Le mannose peut être converti jusqu'au G6P, avec une première conversion effectuée par l'HK. Le cellobiose peut également être converti en glucose. Pour ce qui est des intermédiaires des voies glycolytiques, le F6P, le G6P et le G1P, ils sont utilisés de la même manière entre les deux conditions, avec une légère augmentation de l'intensité pour le F6P et le G6P. Ces intermédiaires sont à l'intersection de plusieurs voies métaboliques, donc leur utilisation pourrait être détournée pour accomplir d'autres réactions métaboliques comme les PP.

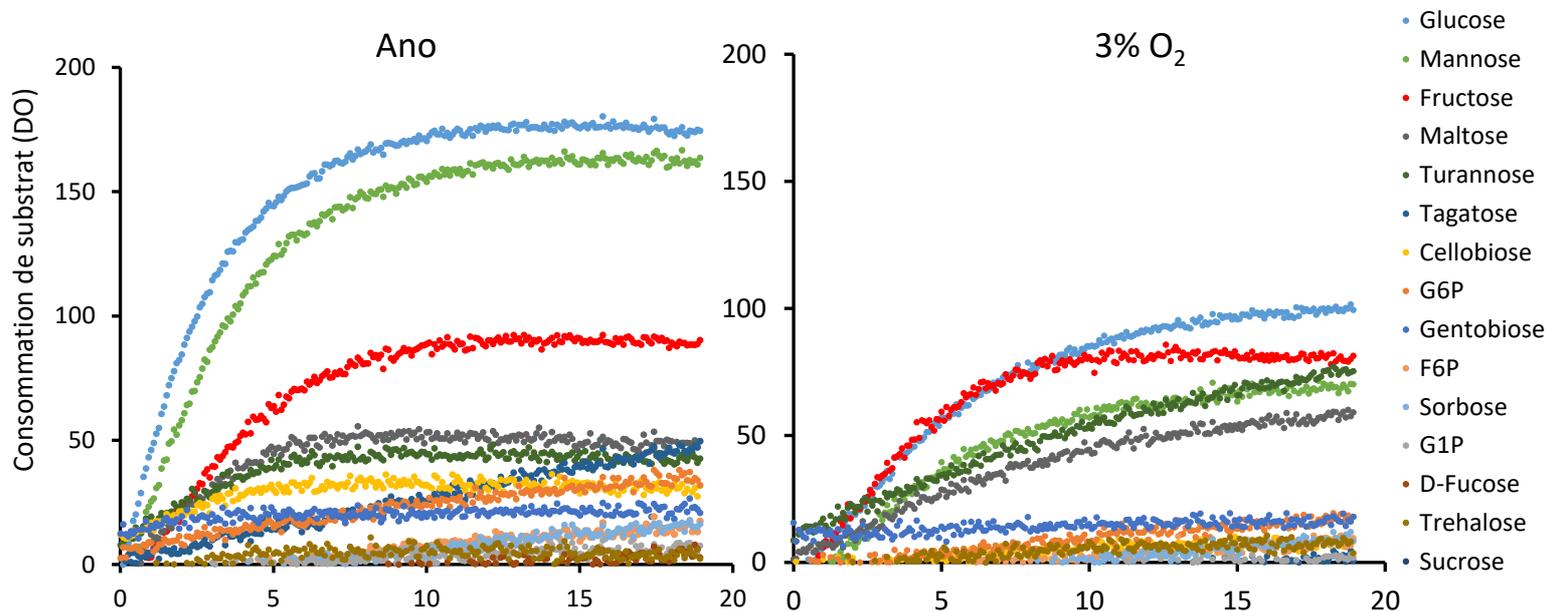


Figure 55. Analyse des voies métaboliques utilisées par consommation de substrat spécifique dans des cultures de cellules hématopoïétiques CD34⁺ en condition d'ANO et à 3% d'O₂. Les cellules hématopoïétiques CD34⁺ ont été incubées dans les différentes conditions expérimentales pendant 19h en présence de différents substrats présents dans les différents puits de la plaque de lecture. Les substrats activent les voies métaboliques productrices de NAD, réagissant avec une sonde colorée et l'absorbance est mesurée par l'appareil Omnilog. Les courbes représentent la consommation de substrat en fonction du temps. Les substrats présentés sur ces graphiques sont des sucres simples.

Les sucres complexes (polysaccharides) sont les sucres qui comprennent un enchainement de sucres supérieur à deux. Le glycogène et le maltotriose, des polysaccharides de glucose sont utilisés pour être dégradé en sucre simple et être utilisé par la glycolyse. Dans la condition physiologique ces oses complexes sont plus utilisés qu'en Ano à l'exception du mannan (Figure 56). L'utilisation préférentielle de polysaccharides comme le glycogène leur permet d'utiliser moins de substrat puisqu'une molécule de glycogène contient de dix à quinze molécules de glucose. Le mélézitose, composés de deux glucose et d'un fructose, est utilisé de manière peu intensive dans les deux conditions expérimentales. Le raffinose et le stachyose ne sont pas utilisés dans aucune des deux conditions. Les humains ne possèdent pas l'enzyme α -galactosidase capable d'hydrolyser le raffinose en saccharose et galactose, ainsi cet oligoside n'est pas utilisable par les cellules CD34⁺ comme substrat énergétique. Il en est de même pour le stachyose.

Ces observations peuvent indiquer que l'Ano est une condition limitante en énergie, et donc les réactions coûteuses en énergie, comme les réactions enzymatiques qui hydrolysent les liaisons des oligosaccharides, sont diminuées par rapport à la condition à 3% d'O₂.

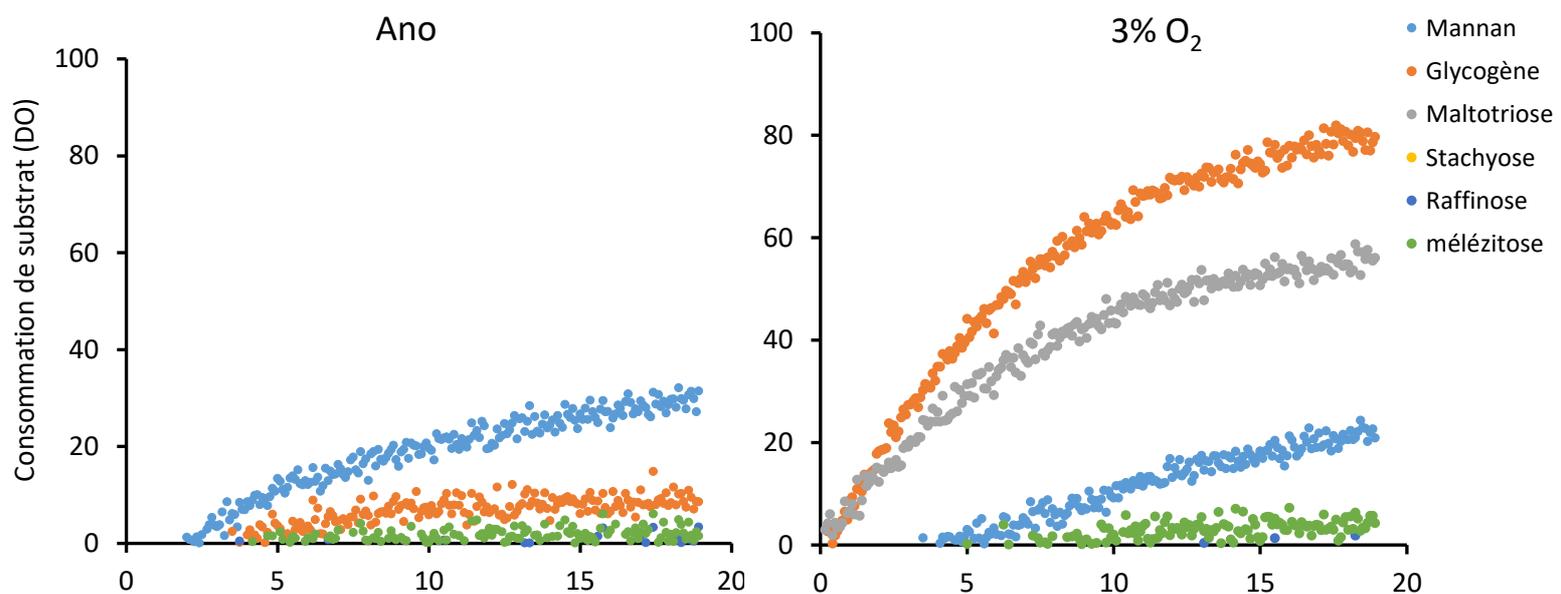


Figure 56. Analyse des voies métaboliques utilisées par consommation de substrat spécifique dans des cultures de cellules hématopoïétiques CD34⁺ en condition d'ANO et à 3% d'O₂. Les cellules hématopoïétiques CD34⁺ ont été incubées dans les différentes conditions expérimentales pendant 19h en présence de différents substrats présents dans les différents puits de la plaque de lecture. Les substrats activent les voies métaboliques productrices de NAD, réagissant avec une sonde colorée et l'absorbance est mesurée par l'appareil Omnilog. Les courbes représentent la consommation de substrat en fonction du temps. Les substrats présentés sur ces graphiques sont des sucres complexes.

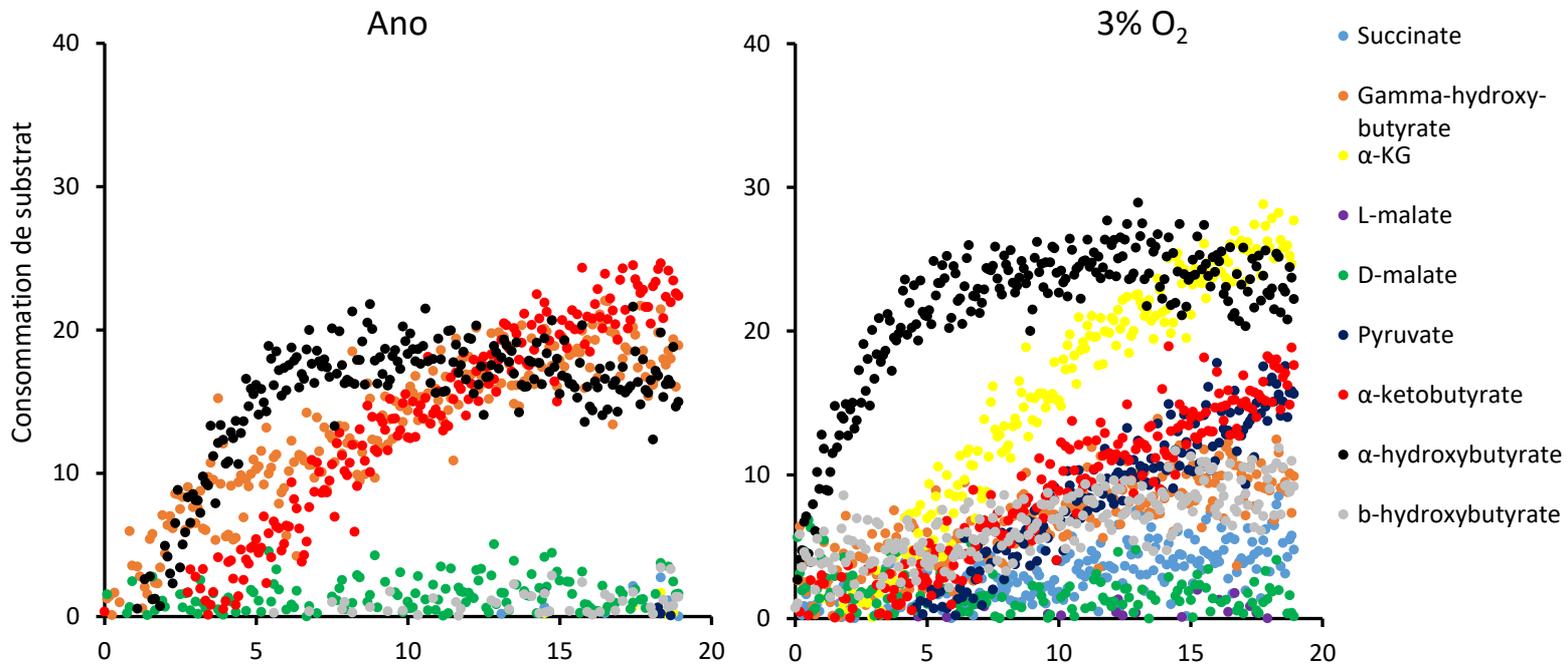
Ensuite, nous avons regardé les mesures d'absorbance pour les substrats mitochondriaux dans les deux conditions d'anoxie et à 3% d'O₂. Cette analyse montre que les intermédiaires du cycle de Krebs, succinate, α-KG, ainsi que le pyruvate ne sont pas utilisés par les cellules dans la condition d'Ano indiquant une activité mitochondriale réduite en absence d'O₂. Deux isoformes du malate ont été testées et le D-malate est faiblement détecté dans les deux conditions alors que le L-malate n'est détecté dans aucune des deux conditions.

Dans cette condition, 3 substrats dérivés des voies des corps cétoniques, l'α-ketobutyrate, l'α-hydroxybutyrate et le γ-hydroxybutyrate produisent un faible signal en Ano. Dans cette condition, les cellules CD34⁺ possèdent des mitochondries peu actives mais bien présentes et nécessaires à la survie cellulaire. Comme pour ce que nous avons observé sur les CStrom, l'acétylCoA produit par la β-oxydation ou le métabolisme des acides aminés ramifiés peut être converties en acétoacetylCoA par la cétogenèse, générant de l'acétoacétate. Cet acétoacétate donne du D-β-hydroxybutyrate ainsi que de l'acétone par décarboxylation lente et spontanée. Cette réaction entre l'acétoacétate et le β-hydroxybutyrate est une réaction réversible. Cet intermédiaire peut donc alimenter cette réaction et permettre la formation d'acétone. L'acétone peut ensuite être converti en lactate et donner du pyruvate, substrat de la gluconéogenèse. Cette réaction permettrait ainsi d'alimenter les cellules en glucose.

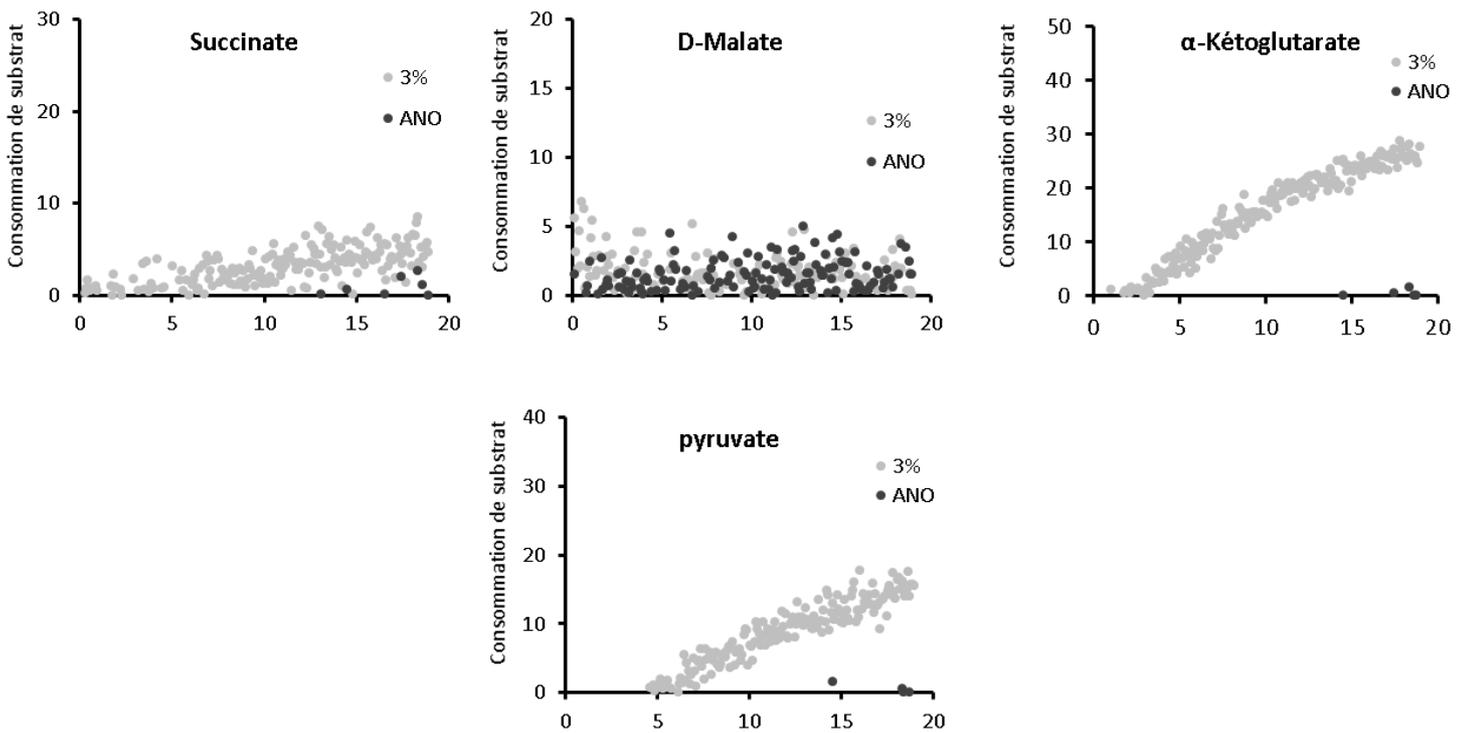
Pour la condition à 3% d'O₂, nous avons observé une détection pour les substrats du cycle de Krebs, notamment pour l'α-KG, qui est l'intermédiaire de cette voie le plus détecté.

Pour l'ensemble de ces composés, malgré la détection le signal reste faible. La condition physioxique de 3% d'O₂ est une condition optimale pour les cellules hématopoïétiques CD34⁺, qui devraient pouvoir utiliser pleinement l'ensemble des voies cytoplasmiques et mitochondriales. En comparaison aux signaux reçus pour les sucres simples, les substrats mitochondriaux sont très faiblement détectés. Ces résultats peuvent être dus au type de marqueur tétrazolium utilisé. Le marqueur MB capte les électrons de la réaction d'oxydo-réduction du NAD et NADH. Il capte donc facilement les électrons produit par la glycolyse. Cependant, il est moins spécifique des électrons mitochondriaux. C'est pour cela que l'utilisation de marqueur plus spécifique de la mitochondrie (MC), utilisé notamment dans la seconde expérience pourraient à terme permettre d'augmenter le signal.

A.



B.



C.

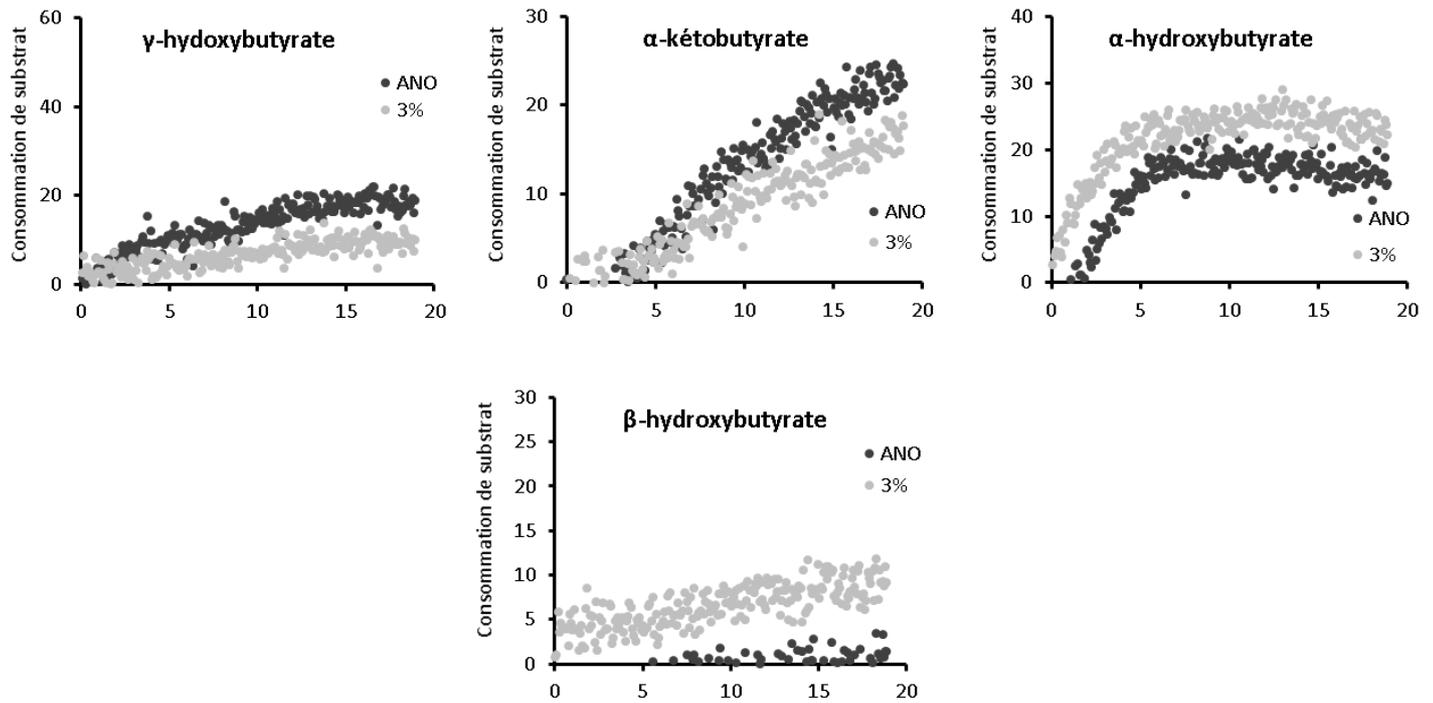


Figure 57. Analyse des voies métaboliques utilisées par consommation de substrat spécifique dans des cultures de cellules hématopoïétiques CD34⁺ en condition d'ANO et à 3% d'O₂. Les cellules hématopoïétiques CD34⁺ ont été incubées dans les différentes conditions expérimentales pendant 19h en présence de différents substrats présents dans les différents puits de la plaque de lecture. Les substrats activent les voies métaboliques productrices de NAD, réagissant avec une sonde colorée et l'absorbance est mesurée par l'appareil Omnilog. A. Les courbes représentent la consommation de substrat en fonction du temps. Les substrats présentés sur ces graphiques sont des composés utilisés par les voies mitochondriales. B.et C. Résultat par métabolite de la consommation en substrat au cours du temps mesuré par colorimétrie. Ces graphiques sont un exemple des métabolites présentés dans la figure 57A. Les métabolites présentés en B qui sont des substrats du cycle de Krebs et les métabolites présentés en C sont des substrats des corps cétoniques et de la β -oxydation.

En conclusion, en Ano, les cellules semblent utiliser majoritairement les sucres afin d'alimenter la glycolyse pour produire de l'ATP. La présence de substrats mitochondriaux ne semble pas permettre aux cellules hématopoïétiques de la condition d'Ano de produire de l'énergie. En adéquation avec le profil énergétique, ces résultats indiquent une diminution conséquente du métabolisme mitochondrial dans cette condition en comparaison à la condition à 3% d'O₂, ou le métabolisme semble être plus équilibré et utilise l'ensemble des substrats mis à sa disposition pour une production optimale d'ATP.

Pour pouvoir analyser de manière plus spécifique les substrats utilisés par les voies mitochondriales, nous avons utilisé la plaque S-1 qui, de la même manière que la plaque PM-M1 mesure la consommation de substrat au cours du temps, mais cette fois ci sur des cellules perméabilisées à l'aide d'un détergent (saponine), qui permet de faire rentrer plus facilement les substrats coatés au fond des puits dans la mitochondrie (Figure 34).

L'obtention des résultats de l'utilisation de cette seconde expérience a connu des problèmes techniques. En effet, lors des premiers essais, nous n'avions aucun résultat concernant les substrats glycolytiques présents sur les deux premières lignes de la plaque. Après réflexion, nous avons finalement compris que l'utilisation de la saponine comme préconisé par le fournisseur permettait en effet de lyser la membrane plasmique et de garder la membrane mitochondriale intact pour ne laisser que les mitochondries mais la glycolyse se déroule dans le cytoplasme et l'ensemble des enzymes nécessaires aux réactions sont alors perdues dans le milieu de culture.

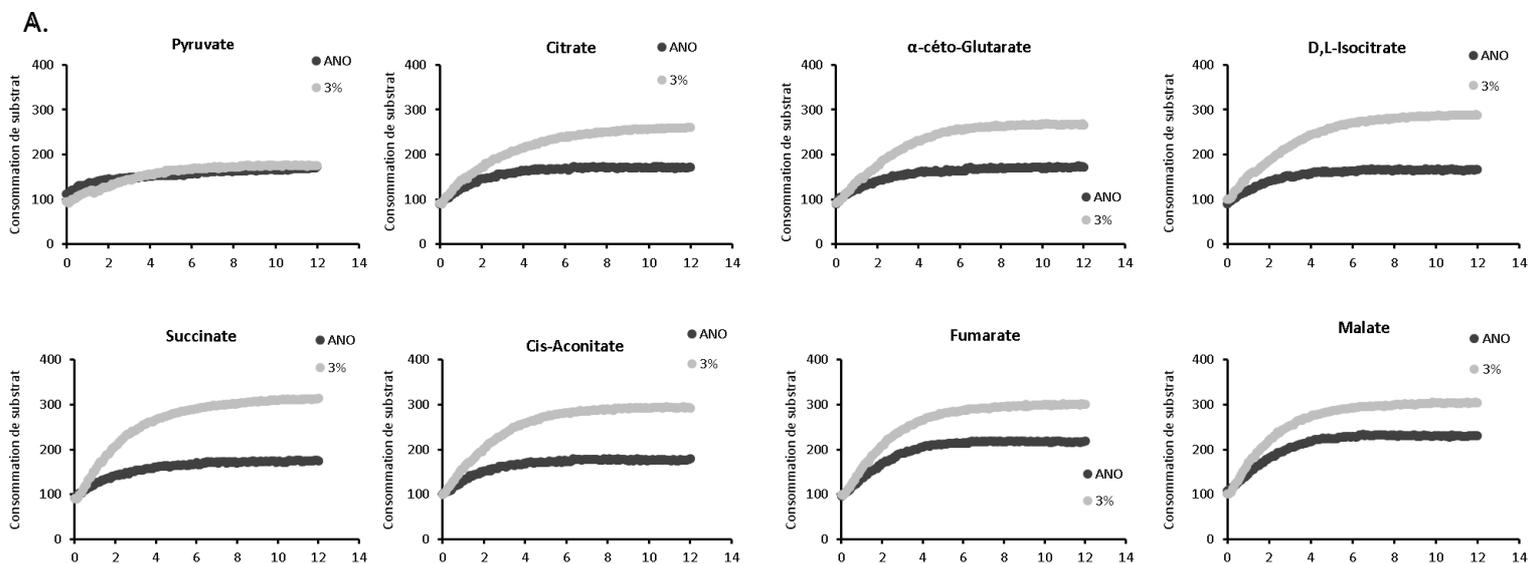
De plus, l'utilisation du marqueur spécifique du Cyt-C, le marqueur MC, préconisé pour l'expérience ne permet probablement pas la détection des voies glycolytiques, notamment pour la condition d'Ano qui n'utilise pas la mitochondrie pour la production d'énergie. Pour la condition expérimentale d'AA, il en est de même. Si les cellules hématopoïétiques CD34⁺ utilisent les mêmes voies métaboliques permettant leur survie, elles ne semblent pas utiliser l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire et notamment le CIII et le Cyt-C avec le quel réagit le marqueur MC.

Pour les dernières expériences concernant la condition d'AA, nous avons donc adapté les expériences en utilisant plusieurs marqueurs différents pour la condition AA, l'appareil étant présent que quelques semaines sur Bordeaux. En résumé, nous avons effectué une expérience pour l'Ano et pour 3% d'O₂ dans les conditions classiques avec le marqueur tétrazolium MC (détection des électrons du cyt-C) et une expérience pour la condition AA avec des adaptations présentées en annexe (Marqueur MB et MC et différentes concentrations de saponine).

Nous avons obtenu des résultats préliminaires intéressants. Les résultats sont à analyser de manière indépendante entre les conditions d'Ano ou de 3% d'O₂ et la condition d'AA. Les résultats pour les deux premières conditions sont obtenus à partir du marqueur tétrazolium MC et pour la condition AA, le marqueur tétrazolium MB. L'aspect des courbes est donc différent. Les substrats glycolytiques n'ont pas pu être détectés pour la condition d'Ano et de 3% d'O₂, et leur détection en AA ne reflète pas des conditions réelles d'une condition de type ischémique.

Nous avons pu analyser 8 substrats mitochondriaux (ligne 4 et 5) comprenant le citrate, l'isocitrate, l' α -KG, le succinate, le fumarate, le cis aconitate, le malate et enfin le pyruvate. Les 7 premiers substrats font partie des intermédiaires du cycle de Krebs. L'utilisation des substrats mitochondriaux est minimale pour l'Ano par rapport à la condition à 3% d'O₂ (Figure 58A). L'avantage de l'utilisation du test de phénotypage sur la mitochondrie isolée avec un marqueur tetrazolium plus spécifique de la mitochondrie nous permet d'augmenter le signal d'absorbance qui était très faible sur l'analyse des plaques PM-M1 pour ces deux conditions. Le signal détecté en Ano reste élevé, ce qui montre que les mitochondries sont moins actives mais présentes et sont capables de flexibilité et de s'adapter.

Pour la condition d'AA, l'utilisation des substrats mitochondriaux du cycle de Krebs est maximale au cours du temps (Figure 58B). Il est intéressant de noter que la phase de plateau n'est toujours pas atteinte après 19h de réaction et les absorbances sont comprises entre 250 et 300 de DO. Ces résultats tendent vers ce que l'on observe à 3% d'O₂, où la phase de plateau semble atteinte. Il faudrait pouvoir refaire ces expériences en utilisant le même marqueur pour comparer les conditions d'AA avec la condition à 3% d'O₂. Néanmoins ces résultats montrent que les cellules incubées en condition mimant l'ischémie sont capables d'utiliser la mitochondrie et de faire tourner le cycle de Krebs de manière intense.



B.

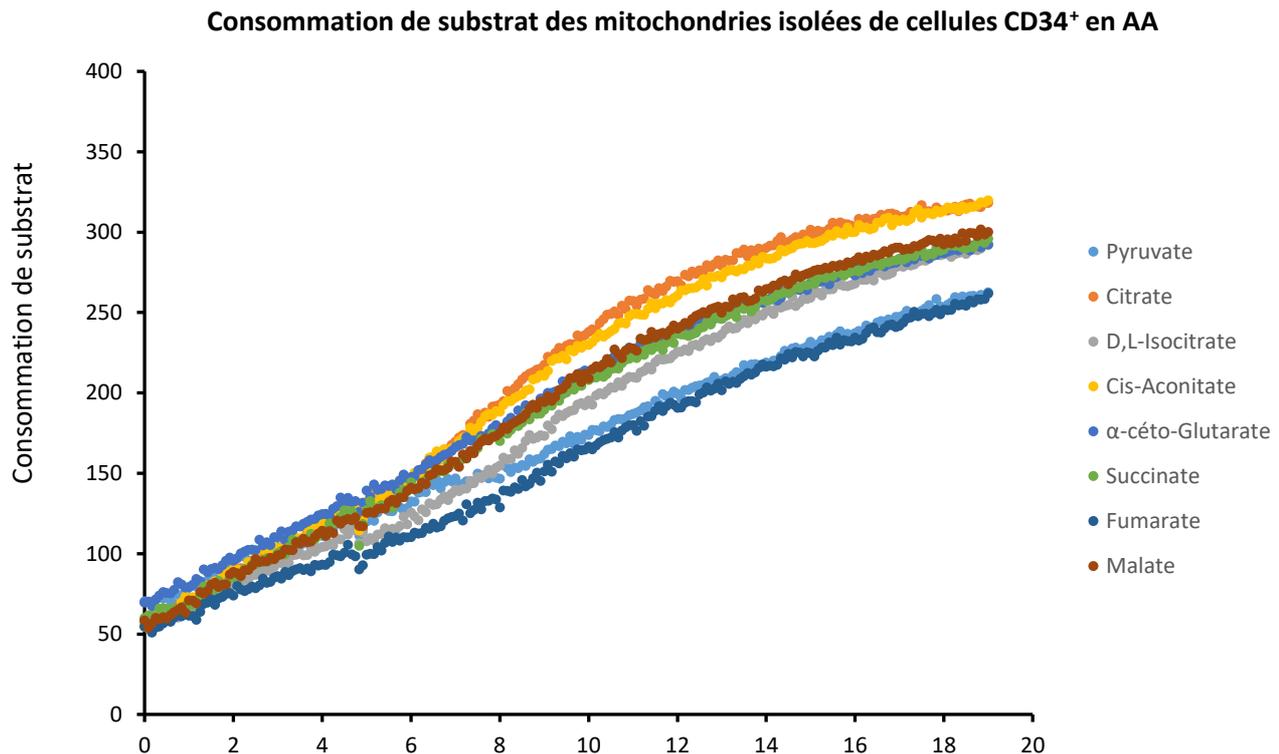


Figure 58. Analyse des voies métaboliques utilisées par consommation de substrat spécifique par des mitochondries isolées dans des cultures de cellules hématopoïétiques CD34⁺ en condition d'AA, d'ANO et à 3% d'O₂. Les cellules hématopoïétiques CD34⁺ ont été incubées dans les différentes conditions expérimentales pendant 12 à 19h en présence de différents substrats présents dans les différents puits de la plaque de lecture et de saponine. Les substrats activent les voies métaboliques productrices de NAD, réagissant avec une sonde colorée mesurée par l'appareil Omnilog. Les graphes représentent l'activation des voies de production énergétique mitochondriale en fonction du temps. A. Les courbes représentent les résultats par métabolites de la consommation en intermédiaires du cycle de Krebs et le pyruvate au cours du temps mesurés par colorimétrie (MC). B. Le graphe représente l'ensemble des 8 substrats détectés par la réaction colorimétrique du marqueur tétrazolium non spécifique de la mitochondrie (MB).

Analyse de l'utilisation du métabolisme des sulfides dans des cellules hématopoïétiques CD34⁺ issues des cultures en AA, ANO et à 3% d'O₂

Les résultats précédemment observés et analysés nous ont permis de conclure que les cellules hématopoïétiques CD34⁺ présentent un profil bioénergétique similaire à ce que nous avons observé pour les CStroM de MO. Avec l'ajout des analyses faites grâce à la technologie Biolog, et dans l'attente d'analyse OMICS sur ce type cellulaire, nous avons décidé d'étudier le métabolisme des sulfides dans les différentes conditions d'AA, d'Ano et à 3% d'O₂.

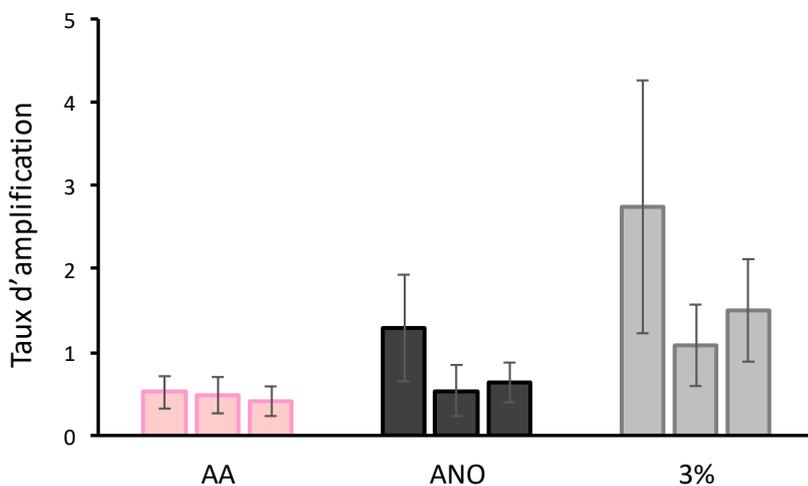
Pour pouvoir estimer si la survie des cellules CD34⁺ est associée au métabolisme des sulfides comme c'est le cas avec les CStroM nous avons estimé le taux d'expansion en présence ou absence des donneurs de H₂S (GYY4137 ou AP39) et mis en culture les cellules dans les différentes conditions expérimentales d'AA, d'Ano et à 3% d'O₂ (Figure 59A). Cette étude ne montre pas de différence

significative entre les cellules pré-conditionnées ou non avec les donneurs de sulfide dans la condition AA. Cependant, dans les deux autres conditions, une diminution de $\pm 50\%$ de l'expansion des cellules CD34⁺ est observée en présence des deux donneurs de sulfide. En anoxie les cellules ne prolifèrent plus et semble même diminuer de moitié par rapport aux cellules incubées sans donneurs. Dans la condition à 3% d'O₂, les cellules se maintiennent et ne prolifèrent également plus par rapport aux cellules incubées sans donneur de sulfide.

Ces résultats suggèrent que le H₂S est utilisé pour la survie des cellules hématopoïétiques CD34⁺ dans des cultures sans O₂ et sans glucose, alors qu'il semble toxique et provoque une diminution de l'expansion des cellules à 3% d'O₂, voire une diminution de la survie en Ano. Les résultats de Western Blot montrent que la SQOR semble être présente en plus grande quantité dans les cellules incubées en AA par rapport aux cellules en Ano et à 3% d'O₂ (Figure 59B).

Le recyclage du H₂S se fait par le glutathion. Nous avons également, de la même manière que pour les CStrom, mesuré la quantité de GSH et GSSG par luminométrie dans les cellules CD34⁺ (Figure 59C, D et E). Nous avons constaté une diminution du ratio (Figure 59E) provoqué par une diminution du GSH (Figure 59D) dans la condition mimant l'ischémie par rapport à la condition d'Ano et à 3% d'O₂. Nous ne détectons pas de différence entre les conditions, au niveau de la quantité de GSSG mesurée (Figure 59F).

A.



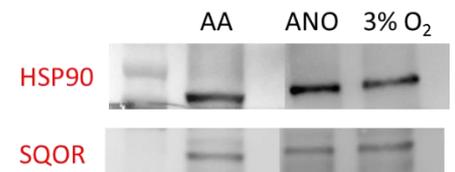
⊖

AP39 50μM

GGY4137 50μM

+	-	-	+	-	-	+	-	-
-	+	-	-	+	-	-	+	-
-	-	+	-	-	+	-	-	+

B.



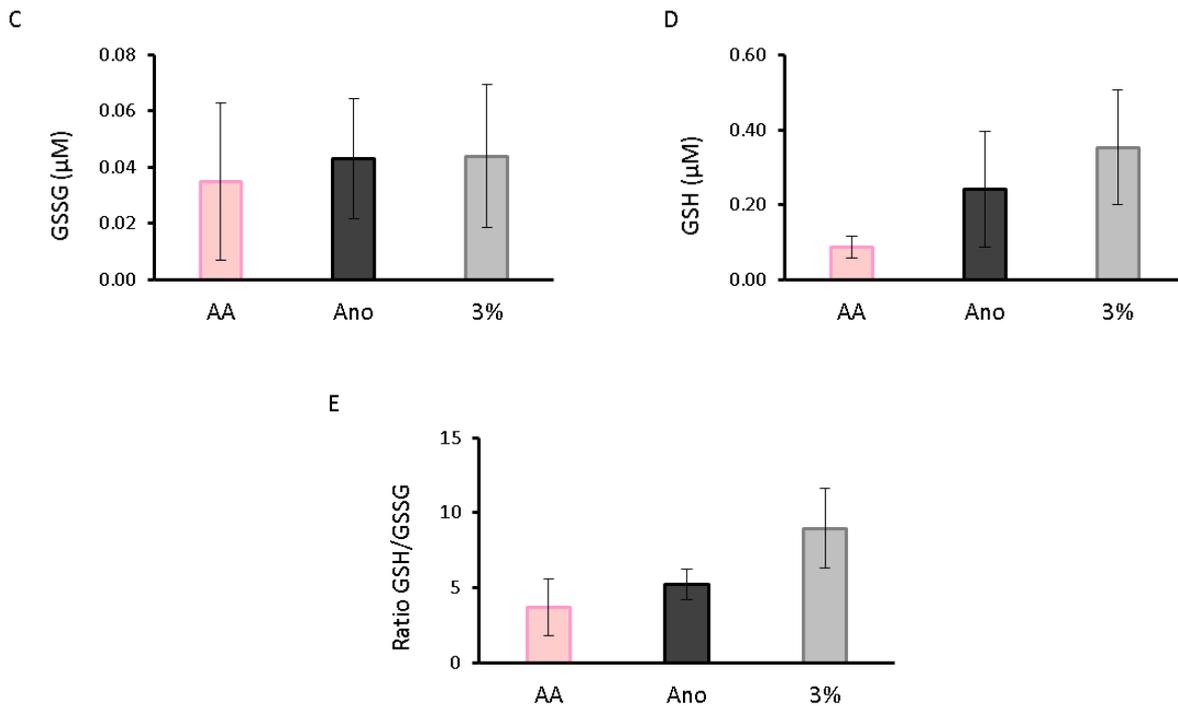


Figure 59. Analyse de l'implication du métabolisme du H₂S dans les cultures de cellules hématopoïétiques de CD34⁺ en AA, ANO et à 3% d'O₂. À la fin de la période d'incubation de 7 jours, les cellules CD34⁺ totales ont été analysées. A. Taux d'expansion de cellules hématopoïétiques CD34⁺ après 7 jours de culture dans les 3 conditions expérimentales (AA, ANO et 3% d'O₂) en présence (50μM) ou en absence de donneur de H₂S : GYY4137 et AP39. Les barres représentent la moyenne du taux d'expansion ± EM de 3 expériences. B. Analyse par Western Blot de l'expression de l'enzyme SQOR dans des cellules CD34⁺ après 7 jours de culture dans les 3 conditions expérimentales (AA, ANO et 3% d'O₂). Protéine contrôle = HSP90 (90 kDa). Cette image est représentative de 2 expériences différentes C. et D. Glutathion oxydé (GSSG) et glutathion réduit (GSH) calculé par leur concentration respective dans les cellules hématopoïétiques CD34⁺ obtenues après 7 jours de culture dans les 3 conditions expérimentales (AA, ANO et 3% d'O₂). Nombre de donneurs = 3. E. Rapport glutathion réduit/oxydé (GSH/GSSG) calculés par leur concentration respective dans les cellules hématopoïétiques CD34⁺ obtenues après 7 jours de culture dans les 3 conditions expérimentales (AA, ANO et 3% d'O₂). Nombre de donneurs = 3. Les astérisques indiquent une différence significative entre les différentes conditions expérimentales à *p < 0,05, test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

DISCUSSION

Ce travail de recherche a mis en évidence les voies métaboliques utilisées par les CStroM et les cellules CD34⁺ pour survivre, se maintenir, ou encore proliférer dans des conditions extrêmes sans O₂ ou sans O₂ et sans glucose.

Les études fonctionnelles, énergétiques et transcriptomiques/protéomiques/métabolomiques effectuées au cours de cette thèse ont mis en évidence la grande flexibilité métabolique des populations de CStroM et de cellules CD34⁺. Cette capacité d'adaptabilité métabolique s'appuie sur l'enrichissement en CS détectées dans la condition d'Ano ou d'AA.

En se basant sur la définition d'une cellule souche (auto-renouvellement et multipotence), seule une petite fraction des cellules stromales mésenchymateuses provenant de la MO peut être considérée comme des CSM (Loncaric et al., 2019; Muraglia et al., 2000). Cette fraction de CSM diminue à chaque passage *ex-vivo* (Lo Surdo & Bauer, 2012). Il en est de même pour la population de cellules CD34⁺ composée d'une majorité de progéniteurs et de rares CS (Krause et al., 1996). Dans nos conditions expérimentales, les cellules prolifèrent en Ano et survivent en AA, où une fraction de ces CStroM et cellules CD34⁺ meurt par apoptose (Figure 35,37, Figure 1A,C article Annexe Vlaski-Lafarge et al., 2020). Les résultats ont révélé que cette fraction exprime de manière significativement plus élevée les gènes de primitivité (gène associés aux fonction des CS, Figure 40) et une grande capacité proliférative et de différenciation (Figure 39 et Figure 2 article Annexe Vlaski-Lafarge et al., 2020). Ces caractéristiques sont les stigmates des CS qui se maintiennent en anoxie et de manière encore plus prononcée en AA où les cellules survivantes sont des cellules primitives, enrichies en CS.

Ces CS ont donc la capacité de s'adapter aux basses concentrations en O₂. Ces observations sont en accord avec les travaux précédemment effectués, qui ont montré que les CS somatiques sont maintenus dans des conditions à basse concentration en oxygène, en comparaison aux cellules différenciées. Les CSH sont localisées dans la MO dans des zones avec la plus faible concentration en O₂, alors que les cellules plus différenciées sont situées dans des zones plus oxygénées de la cavité médullaire (Parmar et al., 2007). Ces résultats supposent aussi que le gradient d'O₂ contribue à la physiologie des CS (comme l'hématopoïèse), ce qui a été confirmé par de nombreuses études *in vitro* (Cipolleschi et al., 1993; Danet et al., 2003; Hermitte et al., 2006; Ivanovic et al., 2004). En résumé, à de très faibles concentrations en O₂ (proches de zéro), les CS sont « conservées » en phase G0; une concentration légèrement plus élevée d'O₂ (~1 %) permet la division des CS sans expansion clonale (auto-renouvellement avec génération de deux CS filles) ; des concentrations intermédiaires d'O₂ (1-

3%) permettent l'auto-renouvellement de CS avec la génération d'une CS fille et d'une cellule progénitrice fille ; des concentrations d'O₂ très élevées (hyperoxique) comme le niveau présent dans l'air atmosphérique (19-21% O₂) conduisent à une prolifération intensive des CS qui donnent naissance à deux progéniteurs, et donc à l'épuisement du pool de CS (Ivanovic, 2009; Ivanovic et al., 2004).

Ces propriétés sont communes aux cellules cancéreuses. Alors que la croissance cellulaire est nettement réduite dans des conditions très faibles en O₂, les CSC sont résistantes à l'hypoxie et sont capables d'expansion significative. Dans les CSC, l'hypoxie sévère sélectionne *ex vivo* un sous-ensemble de cellules avec un potentiel souche (Masala et al., 2018). En résumé, les CS de MO s'adaptent et survivent en anoxie, condition souvent retrouvée dans les tissus cancéreux. Cette capacité de maintien et de prolifération préférentielle des CS en basse concentration d'O₂ permet aux CS d'être dans un état hypométabolique qui permet de limiter la production de ROS et donc du stress oxydatif. L'accumulation de radicaux libres peut endommager pratiquement toutes les biomolécules, notamment l'ADN, les protéines et les lipides. Les CS sont particulièrement vulnérables aux augmentations des niveaux de ROS, principalement générées à partir des complexes mitochondriaux I et III au cours de la différenciation des CStroM et des cellules CD34⁺ (Denu & Hematti, 2016; Vignon et al., 2020). Des niveaux élevés de ROS provoquent des dommages et des dysfonctionnements cellulaires, mais un niveau basal de ROS est nécessaire et avantageux afin de maintenir la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires (Forman et al., 2010). Un excès de ROS et un ajout exogène de H₂O₂ peut altérer l'auto-renouvellement, la capacité de différenciation et la prolifération des CS (Ito et al., 2004; Meagher et al., 1988). Quel que soit le mécanisme, il est clair que la régulation négative de la capacité respiratoire pendant l'Ano est un mécanisme d'économie d'énergie et l'inhibition de la chaîne de transport des électrons peut protéger la cellule.

En plus de se maintenir et de proliférer à basse concentration en oxygène, la survie des cellules CD34⁺ en condition d'Ano ou d'AA a été démontrée précédemment. Des CStroM de MO de rats, cultivées sans O₂ ont maintenu leur morphologie ainsi que l'expression de marqueurs caractéristiques pendant plusieurs jours dans ces conditions (Anokhina et al., 2009). Les pourcentages d'expression de CD90, CD54, CD44, CD29, CD45 et CD11b (marqueurs des CStroM les plus primitifs) étaient les mêmes dans les cultures incubées en concentration atmosphérique et en anoxie. Ces cellules ont continué à proliférer avec une faible mortalité et certaines d'entre elles ont même démontré la capacité d'effectuer les étapes initiales de différenciation ostéogénique et adipogénique. Cependant, la poursuite de la culture des précurseurs dans des conditions d'Ano a déclenché l'activation de l'apoptose dans les cultures, entraînant une nécrose progressive.

La capacité de se maintenir en absence d'O₂ et de glucose a été montrée dans un autre modèle de CS somatiques où des chercheurs français ont découvert que les CS musculaires conservent leur viabilité pendant plusieurs jours après la mort en entrant dans un "état de dormance". Les CS musculaires humaines demeurent dans cet état jusqu'à 17 jours post-mortem, tandis que les CS de la MO de souris, restent viables jusqu'à quatre jours après la mort, tout en maintenant intact leur potentiel de greffe (capacité de reconstitution SRC) (Latil et al., 2012). Ensemble, ces résultats mettent en lumière le caractère « indestructible » des CS somatiques et soulèvent la question des mécanismes sous-jacents.

Ainsi, les résultats de cette thèse obtenus suite à l'étude du profil bioénergétique des CStroM indiquent que les cellules en Ano utilisent majoritairement la glycolyse pour la production énergétique (Figure 42-45). La synthèse de l'analyse omics (analyse du transcriptome, protéome et métabolome) révèlent les adaptations métaboliques empruntées par les CStroM en Ano. Dans la condition anaérobie, le moteur biochimique majeur de la survie cellulaire est la glycolyse/fermentation lactique. Dans cette condition la respiration mitochondriale canonique couplée à la production d'ATP cesse de fonctionner quand la concentration d'O₂ descend en dessous de 22 µM (< 1%), (Chandel et al., 1996). Ainsi dans notre modèle, nous détectons une hausse significative de l'expression des enzymes de la glycolyse (13/162) par rapport à la condition à 3% d'O₂, accompagnée par une augmentation de production du lactate extracellulaire (Figure 45). Nos résultats ont montré une réduction de la masse et de l'activité mitochondriale (Figure 42) et une forte réduction de l'affinité pour le CIV (Figure 43), associées à une diminution de l'expression des complexes de la CRM, des enzymes du cycle de Krebs, de la protéine d'import/export d'ADP/ATP (SLC25A5) et une réduction globale des protéines ribosomales mitochondriales et par conséquent de la synthèse des protéines mitochondriales. En conséquence, la majorité des métabolites du cycle de Krebs sont aussi considérablement réduits par rapport à la condition à 3% d'O₂ (αKG, fumarate, malate et en particulier le succinate (Figure 49, 50 et Figure 66/Annexe 7).

Les CStroM cultivées en Ano se divisent et possèdent les capacités d'expansion (Figure 35) et de multipotence (Figure 39). Dans l'ensemble cela mène à la conclusion que, encore une fois, l'absence d'O₂ n'est le facteur limitant pour la survie et que la glycolyse anaérobie peut être suffisante pour satisfaire les besoins énergétiques et la production des macromolécules (i.e. nucléotides, acides aminés et lipides). Ces macromolécules permettent le fonctionnement cellulaire ainsi que le matériel nécessaire à la construction d'une nouvelle cellule au cours de la division cellulaire (Hume & Weidemann, 1979; Vander Heiden et al., 2009). Cela suggère que le rôle majeur de la glycolyse est de fournir les métabolites permettant la synthèse de la biomasse, comme les nucléotides qui sont leurs éléments constitutifs. La glycolyse est étroitement associée avec leur voie de synthèse via le voie des

PP. Dans notre modèle, nous avons détecté une hausse de l'expression des enzymes des voies de sauvetage de la synthèse des nucléotides (purine pyrimidine et pyridine) moins coûteuse énergétiquement. Egalement, en plus de faire partie de la constitution des acides nucléiques, les nucléotides font parties des coenzymes et des cofacteurs (ATP/ADP, NAD(P)⁺/NAD(P)H, FAD/FADH₂, CoQ/CoQH₂, LA/DHLA) qui jouent un rôle clé dans la régulation des activités enzymatiques pour maintenir l'homéostasie cellulaire. L'analyse protéomique du groupe concernant les processus métaboliques des coenzymes et cofacteurs (figure 47B) montre que les enzymes du cycle de Krebs et de la respiration mitochondriale sont diminuées alors que les enzymes glycolytiques sont augmentées en anoxie. De plus, la synthèse de nucléotides (voie de sauvetage et voie de production de novo) nécessite des métabolites de la voie des PP, le PRPP, comme cofacteurs. Nos résultats ont détecté un niveau réduit de PRPP indiquant sa forte consommation en anoxie. Cette réduction de PRPP par son utilisation intensive en anoxie est en relation avec l'accumulation de l'orotate, intermédiaire de la voie de synthèse des pyrimidines. L'orotate est produit par la DHODH qui oxyde le DHO en orotate médiée par l'ubiquinone et la réduction du FMN en FMNH₂, associant la synthèse de nucléotide avec la bioénergétique mitochondriale. La conversion de l'orotate en orotate-5P dépend du PRPP. En conséquence, le métabolisme de l'orotate est bloqué en raison du manque de substrat enzymatique (PRPP) dans les CStroM en anoxie. Dans notre modèle la stimulation de la glycolyse est également associée avec l'activation de la voie des hexosamines débutant par la conversion du F6P et de la glutamine en Gln-6P, menant à la production de protéolycanes et de glycolipides, importants dans de nombreuses activités cellulaires (prolifération, adhérence, migration, signalisation, structure membranaire [\(Chandel, 2021\)](#)). Enfin, une accumulation de P-Ser vient accentuer l'importance de l'augmentation de la voie glycolytique menant depuis 3PG vers le métabolisme de la Ser/glycine et du folate donnant deux atomes de carbones additionnels pour la synthèse des nucléotides [\(Lunt & Vander Heiden, 2011\)](#).

La prochaine question qui s'impose est la manière dont les CStroM se procurent suffisamment de glucose pour soutenir la prolifération tout au long de la culture. Dans notre modèle, l'augmentation des enzymes de la dégradation du glycogène suggèrent que c'est la glycogénolyse, comme s'est déjà bien établi, qui produit du glucose et du galactose comme substrats glycolytiques. En plus des polysaccharides, les autres monosaccharides comme le fructose et le mannose sont aussi utilisés pour alimenter les différents intermédiaires glycolytiques [\(Chandel, 2021\)](#). De plus, la survie des CStroM en anoxie est significativement réduite en présence de 3MP, inhibiteur de la PEPCK, enzyme limitante de la gluconéogenèse catalysant la conversion de l'OAA en PEP. Les substrats pour la gluconéogenèse sont en premier lieu les acides aminés reliés à la glycolyse (i.e. Asp, Asg, Ala, Gly, Ser et Cys) qui peuvent être utilisés pour être métabolisés jusqu'à l'OAA ou au pyruvate. Cette utilisation se déroule principalement dans le cytoplasme, sans intégration du métabolisme des acides aminés

mitochondriaux via le cycle de Krebs car la respiration mitochondriale canonique en anoxie est inhibée. Ainsi, dans notre modèle, nous avons observés que les enzymes intervenant dans les voies métaboliques de la Pro, Glu, Lys ou Trp, capables de générer les intermédiaires du cycle de Krebs, sont diminuées.

Nous avons également détecté en Ano une stimulation de la β -oxydation péroxisomale et du métabolisme des corps cétoniques, ainsi qu'un engagement en dégradation des acides aminés ramifiés. L'acétylCoA produit par la β -oxydation ou le métabolisme des acides aminés ramifiés peut être converties en acétoacetylCoA par la cétogenèse, générant de l'acétoacétate, qui est à son tour spontanément transformé en acétone. L'acétone peut ensuite être converti en lactate donnant du pyruvate, substrat de la gluconéogenèse. L'acétoacétate peut aussi être converti de manière réversible en β -hydroxybutyrate, un autre métabolite de la voie des corps cétoniques. Son rôle comme substrat énergétique préféré en conditions hypoxiques chez des souris semble permettre une prolongation de leur survie dans cette condition (Cahill, 2006; Kirsch et al., 1980).

La glycolyse fournit également des métabolites qui seront une source de carbones pour la synthèse lipidique. L'activité glycolytique des CStroM en Ano est associée à une accumulation de G3P qui est générée par la conversion réversible de l'intermédiaire glycolytique DHAP, catalysé par l'enzyme cytosolique G3PDH. La production de G3P est cruciale pour la biosynthèse des phospholipides et triacylglycérols et des cardiolipines qui sont les lipides de structures majoritairement retrouvés dans les membranes cellulaires (Lunt & Vander Heiden, 2011).

Le point critique concerne l'équilibre de ratio NADH/NAD^+ qui est fondamental pour le métabolisme (Hosios & Heiden, 2018; Katsyuba et al., 2020; W. Xiao & Loscalzo, 2020). La forme oxydée NAD^+ fonctionne comme un accepteur d'électrons dans diverses voies métaboliques telles que la glycolyse, la β -oxydation, la dégradation des acides aminés ou encore le cycle de Krebs (Ducker & Rabinowitz, 2017; Hosios & Heiden, 2018; Katsyuba et al., 2020; Lunt & Vander Heiden, 2011; W. Xiao & Loscalzo, 2020). Dans notre condition Ano, la régénération de NAD^+ produit par la glycolyse est accomplie dans l'étape finale de l'oxydation du pyruvate en lactate avec l'oxydation du NADH en NAD^+ . Cela régule le flux glycolytique et la survie des cellules en anoxie. Dans les CStroM en Ano, c'est la seule façon de régénérer ces cofacteurs car le transfert des électrons via la navette malate-aspartate (MAS), l'oxydation du NADH par le CI et la réaction catalysé par la GPD mitochondriale (Mráček et al., 2013), sont inhibés en absence d' O_2 . De plus, dans notre modèle, il y a une augmentation de l'enzyme membranaire mitochondriale CYB5R3, qui catalyse le transfert réversible des électrons entre le NADH (issu de divers processus tel que l'élongation et désaturation des AG ou la biosynthèse du cholestérol) et la CoQ (Diaz-Ruiz et al., 2018), contribuant ainsi au recyclage et au maintien du ratio NAD/NADH . De plus, les cellules maintiennent une activité mitochondriale (Figure 42B) qui permet à l'ATP synthase d'hydrolyser l'ATP et évite l'effondrement de la force motrice des protons. Sans ce potentiel de

membrane, l'ouverture du pore de perméabilité membranaire mitochondrial provoque le relargage du cytochrome C, activant les mécanismes de mort cellulaire programmée tels que l'apoptose ou la nécroptose (Kroemer et al., 2007; Zamzami et al., 1995).

Notre analyse a mise en évidence que la reprogrammation métabolique des CStroM en anoxie comprend la stimulation de l'expression des enzymes de la réponse métabolique à la diminution du niveau d'oxygène, dont l'expression est principalement régulée par le facteur de transcription HIF stabilisé (enzymes glycolytiques, métalloprotéases, molécule anti-apoptotique, ferritine). Mais, l'absence de différence d'expression des facteurs HIF entre Ano et physioxie (Figure 41) suggère que d'autres molécules de signalisation fonctionnent en association avec HIF pour assurer la reprogrammation métabolique en anoxie (par exemple le facteur de transcription *MYC* est significativement augmenté en anoxie).

Notre deuxième condition expérimentale, comprend la privation concomitante d'O₂ et glucose pour mimer une condition d'ischémie (AA). La détermination du profil bioénergétique des CStroM a révélé que leur survie sans O₂ et sans glucose est associée avec une activation mitochondriale (Figure 42-45) pour la production d'ATP. Nos résultats ont également montré une augmentation de la masse et de l'activité mitochondriale pour les CStroM en AA par rapport à l'Ano, se rapprochant de la condition contrôle à 3% d'O₂ (Figure 42,43). Dans ces cellules, le contenu en ATP est diminué par rapport aux autres conditions (Figure 44A), mais nous avons mis en évidence que la majorité de l'ATP produit dans ces cellules provenaient de la mitochondrie (Figure 44B).

L'analyse omics a révélé qu'en AA, comme en Ano, la survie est dépendante de l'activité glycolytique alimentée par les intermédiaires venant de la dégradation des polysaccharide et d'autres monosaccharides (mannose, galactose et fructose), mais également de la voie non oxydative des PP. L'activité glycolytique permet la synthèse de nucléotides et de coenzymes puriques via la production des intermédiaires de la voie des PP ainsi que la synthèse des protéoglycanes et glycolipides par la voie des hexosamines. Les CStroM en AA montrent une activité glycolytique significativement plus importante qu'à 3 % d'O₂ mais de manière différentes de l'Ano, l'inhibition de la gluconéogenèse ne réduit pas la survie des CStroM en AA. Cela suggère deux explications possibles : (1) la gluconéogenèse est trop coûteuse en ATP, réduisant le ratio bénéfice/risque pour la survie des CStroM en AA (2) les molécules de pyruvate, source de la gluconéogenèse sont, en premier lieu, utilisées par/pour d'autres voies métaboliques. Le pyruvate n'est pas transformé en lactate mais l'enzyme PDH catalyse sa conversion en acetylCoA et alimente le cycle de Krebs. Cela est accompagné d'une augmentation de l'expression des enzymes du cycle de Krebs (NNT/FAHD1/PDHB/CS), des sous-unités des complexes respiratoires (NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFV1, NDUFA10, NDUFA13, NDUFA5, NDUFA9,

NDUFB10, NDUFB3, NDUFB4, NDUFB9, NDUFB10, NDUFS4, MT-CO2, UQCRC1, UQCRC2, COX5A, COX5B) et de l'ATP synthase (ATP5PD), ainsi qu'une activation de l'activité mitochondriale (Figure 42B) en AA, significativement plus élevée qu'en Ano se rapprochant de celle détectée à 3% d'O₂. La dynamique mitochondriale, opérant sur les modifications de forme et de nombre des mitochondries dans les cellules est reconnue comme un élément essentiel dans la vie et le bon fonctionnement des processus biologiques. Parmi les nombreux types de changements mitochondriaux, la fission et la fusion sont les processus les plus caractérisés. La protéine OPA1 est le modulateur clé de la fusion de la membrane interne et des crêtes mitochondriales (Escobar-Henriques & Anton, 2013; H. Lee et al., 2017). Les cellules déficientes en OPA1 ont des mitochondries fragmentées et présentent des crêtes fortement diminuées, ce qui se traduit fonctionnellement par un défaut d' OxPhos (H. Chen et al., 2005). La hausse d'expression des régulateurs de fusion mitochondriale OPA1 et VAT-1 évoque l'importance de la fonction mitochondriale dans la survie des CStroM en AA. Cette activité est également associée à une production d'ATP mitochondriale (Figure 44, 51B) et une accumulation de succinate (Figure 50).

Dans notre modèle, nous avons mis en évidence que la survie sans O₂ et sans glucose induit la reprogrammation métabolique, intégrant une activité mitochondriale en mode anaérobie associée à une activation du cycle de Krebs et au transfert d'électrons par la CRM de manière inverse. Cela est en accord avec les études récentes montrant les modèles dans lesquels certaines conditions (stress ou hypoxie), bloquent le transfert des électrons vers les complexes III et IV, ce que entraîne ensuite une augmentation de la réduction des couples NADH/NAD⁺ et CoQH₂/CoQ (Kumar & Banerjee, 2021). Dans ces conditions, le fumarate devient l'accepteur final des électrons de la CRM (Blanco & Kaplan, 2023). Les électrons de la réaction de réduction du NADH au niveau du CI peuvent être transférées à la CoQ et ensuite au CII qui fonctionne en mode inverse utilisant la réaction de réduction du fumarate en succinate, couplée à l'oxydation du coenzyme FADH en FAD. Ce flux des électrons est associé à la translocation de protons par le CI formant le potentiel de membrane nécessaire pour la synthèse d'ATP par l'ATP Synthase (Banerjee & Kumar, 2022; Tomitsuka et al., 2010). Dans notre modèle, la diminution de la production d'ATP et la chute de la survie en présence pyruvium pamoate, inhibiteur de la respiration fumarique, témoigne de l'implication de ce circuit dans le métabolisme des CStroM en AA. De plus, de récentes études montrent que la réduction importante de CoQ dans des conditions d'ischémie peut induire le transfert des électrons inverses au niveau de CI et que cela est le principal site de production de ROS au cours de la reperfusion (Chouchani et al., 2016; Gubern et al., 2007; Jia et al., 2020).

A part la production d'ATP, ce circuit contribue à l'accumulation de succinate en condition mimant l'ischémie, détecté dans notre modèle (Figure 49, 50 et Figure 66/Annexe 7) et dans d'autres modèles (Banerjee & Kumar, 2022; Cecchini, 2022; Chouchani et al., 2014; Spinelli et al., 2021). D'autre part

nous avons identifié que, dans la condition AA le succinylCoA provenant du cycle de Krebs, de la dégradation des acides aminés (Leu, Ile, Val, Cys, Met) et du métabolisme des corps cétoniques est convertie en succinate par l'activité de SUCLA2 dont l'expression est également stimulée en AA. Cette réaction permet de former de l'ATP par phosphorylation du substrat. Notre observation est en accord avec l'étude récente révélant que le succinate en condition d'ischémie provient en premier lieu de l'activité du cycle de Krebs (J. Zhang et al., 2018). Le succinate s'accumule également dans d'autres états physiologiques tels que dans le cœur ischémique (Chouchani et al., 2014) et dans les muscles post-exercice (Reddy et al., 2020).

Cependant, en plus du CI, le CoQ est réduit par l'action d'autres déshydrogénases organiques comme la DHOD, la PRODH, la GPD2, la ETF-QO et la SQOR. Dans notre modèle de CStroM incubées en AA, nous avons identifié une stimulation de l'expression de la GPD2, ETF-QO et la SQOR ainsi que la stimulation du métabolisme de la proline. Les travaux de cette thèse ont montré que la survie en AA est reliée avec l'oxydation des sulfides par la SQOR couplée à la CRM (Figures 47,48,54). Dans cette condition nous avons détecté l'augmentation du métabolisme de la sérine permettant la synthèse de la cystéine nécessaire pour la production enzymatique de H₂S. Nous n'avons pas détecté de différence dans l'expression des enzymes impliquées dans la production endogène de H₂S, donc nous ne pouvons pas exclure le fait que le H₂S soit produit non par voie enzymatique (Huang & Xie, 2023).

Par ailleurs, l'accumulation de succinate est une signature des cellules exposées au H₂S (Kumar et al., 2021) et le cycle d'oxydo-réduction avec le CII privilégie la SQOR dépendante de l'oxydation du H₂S (Cecchini, 2022; Spinelli et al., 2021).

Plus précisément, l'oxydation du H₂S par la SQOR forme des persulfures attachés à l'enzyme. Les deux électrons de l'oxydation du H₂S sont transférés via la FAD au CoQ puis à la chaîne de transport d'électrons. Le persulfure lié à l'enzyme SQOR est transféré vers un accepteur tel que le glutathion (GSH), entraînant la génération de persulfure de GSH (GSSH). Le groupe persulfure du GSSH est oxydé en sulfite par une sulfure dioxygénase et l'O₂ (également connue sous le nom ETHE1 ou persulfure dioxygénase). Le sulfite peut être converti en thiosulfate via l'ajout d'un autre GSSH qui est simultanément converti en GSH. Cette dernière réaction est catalysée par la TST (Luna-Sánchez et al., 2017, Figure 20). Nos résultats suggèrent que cette voie d'oxydation est vraisemblablement utilisée dans notre condition d'AA où la SQOR ainsi que la TST ont été révélées comme significativement augmentées en AA par rapport à la condition d'Ano. De plus, nous avons identifié une augmentation de l'oxydation du GSH (GSSG) (Figure F) et en conséquence une diminution du ratio GSH/GSSG (Figure G), qui pourrait être associé avec l'utilisation du GSH comme accepteur des électrons de l'oxydation du H₂S. Dans notre modèle nous avons détecté une diminution de l'enzyme de synthèse du GSH à partir de la cystéine. Ce mécanisme sert à orienter la cystéine vers la production de H₂S en

AA plutôt que vers la production de GSH. Egalement, nous avons détecté une augmentation de GSO, dont la fonction principale est de protéger les cellules vivantes contre une grande variété de molécules toxiques en les conjuguant avec le glutathion. Cette réaction de conjugaison oxydoreductrice est sensible aux modifications post-traductionnelles (S-glutathionylation) des protéines (Mazari et al., 2023).

La baisse de l'oxygénation et l'insuffisance nutritive induit la stimulation de la production de H₂S qui, ensuite, détermine des effets protectifs variés (Banerjee & Kumar, 2022). Cela se passe au moins partiellement, par action menée par le facteur HIF stabilisé ou les facteurs régulant la réponse au stress du RE (Kabil et al., 2016). Le changement des métabolites dépendant de l'hème régule la synthèse de H₂S en réponse au stress du RE.

L'Ano, ainsi que l'AA sont comparées à une condition à 3% d'O₂ qui représente la concentration physioxygène moyenne dans laquelle se trouvent les cellules *in vivo* dans la MO. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, l'apparition de l'O₂ sur terre a permis le développement des organismes complexes autour de l'évolution d'un mécanisme respiratoire de production de l'énergie. Mais le besoin d'O₂ comme substrat métabolique s'oppose au risque de dommages oxydatifs des macromolécules cellulaires. C'est pourquoi sa concentration au sein des cellules est maintenue dans une gamme étroite (1 à 5% d'O₂) qui équilibre de manière optimale l'offre et la demande. Le caractère microaérophilique leur offre la possibilité de se développer de manière optimale dans les différents compartiments cellulaires, offrant aux cellules la possibilité d'assurer leur fonction au niveau des différents gradients d'O₂ présent, en effet, les CstroM proviennent d'une multitude de tissus qui présentent des concentrations d'O₂ différentes.

Dans la condition à 3% d'O₂, les mitochondries sont actives (Figure 42) et intégrées dans la production optimale d'ATP (Figure 44) à partir des différents substrats présents dans le milieu de culture comme le glucose ou encore les AG présents dans le sérum. La glycolyse et la β-oxydation couplée avec les OxPhos permettent de fournir l'énergie nécessaire à une expansion cellulaire optimale (Figure 35).

L'Analyse métabolique a révélé que les cellules CD34⁺ montrent une utilisation préférentielle de la glycolyse en Ano (Figure 55, 56, 57 et Figure 4 article Annexe (Vlaski-Lafarge et al., 2020)). En Ano, les cellules CD34⁺ utilisent la voie glycolytique de manière plus intensive que les cellules à 3% d'O₂ (Figure 55, 56). La particularité de ces résultats est qu'ils précisent que les cellules CD34⁺ utilisent majoritairement des sucres simples pour alimenter la glycolyse au niveau des différents intermédiaires (Figure 55). En revanche la dégradation des sucres complexes reste limitée dans cette condition, alors qu'elle paraît optimale dans la condition de contrôle physioxygène. Ceci pourrait être dû, d'une part à

la minimalisation de l'utilisation d'énergie afin de permettre aux cellules de proliférer dans ces conditions (Figure 35) et d'autre part au fait que les enzymes de dégradation de certains polymères comme l'amidon (α -amylase) seraient produites dans des compartiments spécifiques comme la salive ou le pancréas (Ao et al., 2007). Comme attendu, l'utilisation de la mitochondrie pour la production énergétique semble diminuée en Ano comparée à la condition à 3% d'O₂. Les mitochondries sont bien présentes et fonctionnelles (Figure 4B article Annexe (Vlaski-Lafarge et al., 2020) et Figure 57). En effet, en Ano, les intermédiaires du cycle de Krebs ne sont pas utilisés, mais les intermédiaires des corps cétoniques semblent faire fonctionner la réaction redox du NAD/NADH. Les corps cétoniques permettent de produire de l'acétylCoA qui est certes un intermédiaire du cycle de Krebs, mais peut aussi être utilisé par la gluconéogenèse pour reconstituer du glucose et faire tourner la glycolyse. La réaction d'oxydoréduction NAD/NADH détectée provient principalement du NAD/NADH cytosolique, donc les cellules CD34⁺ semblent orienter la voie des corps cétoniques vers la production de glucose. En regardant plus précisément la production énergétique de mitochondries isolées, nous avons pu conclure que la mitochondrie est bien présente en Ano (Figure 4B article Annexe (Vlaski-Lafarge et al., 2020) mais sa fonction reste plutôt constitutive et permet le maintien des voies mitochondriales anaplérotiques pour alimenter les intermédiaires glycolytiques ou produire de la biomasse pour permettre la prolifération des cellules CD34⁺.

En comparaison, les cellules incubées en AA montrent une activation de la mitochondrie anaérobie (Figure 4B), corrélée avec une augmentation de la production d'ATP mitochondrial (Figure 4A). L'étude des voies bioénergétiques mitochondriales a révélé une utilisation importante du cycle de Krebs. Les cellules augmentent la réaction énergétique au cours du temps (Figure 58B). De manière intéressante, la détection a été faite par une sonde qui détecte de manière générale la réaction d'oxydo-réduction du NAD/NADH. Sur mitochondrie isolée, cette réaction peut surtout intervenir au niveau du cycle de Krebs avec la réaction catalysée par l' α -KG déshydrogénase et la malate déshydrogénase, ainsi qu'au niveau du CI de la CRM. L'ensemble des 7 intermédiaires du cycle de Krebs (citrate, α -KG, isocitrate, succinate, Cis-aconitate, fumarate et pyruvate) dans cette condition semble faire tourner le cycle de Krebs pour produire de l'énergie et utiliser le CI comme démontré par Tomitsuka et son équipe, où le CI alimente le CII qui fonctionne de manière inverse en réduisant le fumarate en succinate. L'accumulation de succinate détectée dans les cellules CD34⁺ (Figure 4C article Annexe (Vlaski-Lafarge et al., 2020) pourrait, comme pour les CStroM, provenir de la phosphorylation du substrat de l'enzyme du cycle de Krebs, la succinylCoA synthétase ou de la réduction du fumarate pour le CII. Au départ de la réaction, une quantité minimale d'O₂ reste et on observe seulement une légère augmentation de l'absorbance, mais à partir de 6h de réaction, il semble que l'O₂ soit consommé, et une forte augmentation des voies mitochondriales est observée à partir des 7 substrats du cycle de Krebs. Les cellules se mettent à utiliser la mitochondrie de manière intensive. En ischémie, des études isotopiques

ont montré que la production de succinate des cardiomyocytes provenait majoritairement de la production de fumarate par le cycle de Krebs, le cycle des purines nucléotides, la navette malate-aspartate et la réaction inverse de l'enzyme succinate déshydrogénase mitochondriale (Chouchani et al., 2014). Les cellules CD34⁺ semblent utiliser les mêmes mécanismes sur des périodes plus importantes par leur capacité d'adaptation conservée.

Ces résultats joignent les observations faites sur le comportement des CsStroM indiquant que les reprogrammations métaboliques en absence d'O₂ et /ou absence de glucose présentent un caractère universel au sein des différentes populations de CS. Cependant, la survie des CD34⁺ en AA, n'ayant pas été considérablement modulée par la présence du donneur de H₂S (Figure 59), pourrait suggérer que l'implication du métabolisme des sulfides ne suit pas le même schéma que pour les CstroM. Ce point sera travaillé dans le futur.

L'ensemble de ces résultats montrent que le facteur limitant des cultures de CS de MO n'est pas l'O₂ mais le glucose. Les cellules prolifèrent, certes, mais une augmentation significative de l'apoptose dans cette condition entraîne non pas une amplification mais un maintien de ces cellules. En revanche, les cellules en Ano prolifèrent en se reposant principalement sur la glycolyse pour produire de l'énergie tout en maintenant les mitochondries pour le maintien du potentiel de membrane et des voies anaplérotiques afin de soutenir la production de biomasse nécessaire à l'amplification cellulaire. Les cellules cultivées dans un milieu dépourvu de glucose se reposent alors sur la mitochondrie pour produire de l'ATP, et toutes les réactions bioénergétiques semblent converger vers cette dernière pour permettre d'alimenter les voies de production d'ATP limitant la production de biomasse. La production énergétique par la glycolyse anaérobie était déjà utilisée par les premiers organismes procaryotes et est retrouvée dans de nombreux types de CS différents qui utilisent cette voie métabolique aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* du fait de leur localisation dans des zones à faible concentration en O₂ (Simsek et al., 2010). L'utilisation préférentielle de la glycolyse anaérobie par les CS n'est pas uniquement liée aux basses concentration en O₂ mais aussi à une qualité intrinsèque de ce type cellulaire puisque les CS localisées dans des zones plus oxygénées comme les CS de sang périphériques possèdent un profil glycolytique également très marqué, notamment par l'activation de HIF (Iyer et al., 1998). Les CStroM en AA se comportent comme les CSC (Tomitsuka et al., 2010), et certains protistes (M. Müller et al., 2012) qui ont la capacité d'utiliser certains complexes de la CRM pour assurer le passage des protons, permettant au potentiel mitochondrial ainsi formé de faire fonctionner l'ATP synthase pour former de l'ATP. Les CS, à l'instar des cellules différenciées sont capables d'utiliser l'ensemble des voies utilisées par les premières cellules au fil de l'évolution. Ces mêmes voies qui sont retrouvées chez les organismes capables de respiration mitochondriale en mode aérobie et anaérobie, s'adaptant aux différentes conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent. Lors du développement

des premiers eucaryotes, avant l'apparition de l'O₂, la terre était riche en sulfide et ils étaient largement présents dans la soupe primitive, principale source de substrat pour les premières cellules (Gaill, 1993). Avec l'apparition de l'O₂, certaines cellules ont développé des systèmes de production d'énergie basés sur cet O₂ mais ont gardé la capacité d'utiliser le H₂S, en l'intégrant au système des OxPhos. Les CS, sont les seules cellules chez l'homme à avoir gardé la capacité extraordinaire de pouvoir survivre dans les conditions qui existaient il y a des milliards d'années. La comparaison entre les caractéristiques métaboliques énergétiques des principaux groupes d'eucaryotes et de cellules souches a montré que la nature anaérobie des CS de mammifères est une caractéristique ancestrale héritée des eucaryotes unicellulaires. Le degré de maintien du caractère primitif (capacité d'auto-renouvellement et de différenciation) des CS est associé à l'anaérobiose, à la nano-aérobiose et à la micro-aérobiose (le long de l'évolution du premier eucaryote commun, du dernier eucaryote commun et des métazoaires), Les mécanismes contrôlant la physiologie des CS sont évidemment liés au type métabolique/énergétique et à la détection de l'oxygène (De Miguel et al., 2015). Chacun de ces mécanismes est lié à l'évolution et aux conditions présentes dans les niches écologiques, notamment en terme d'oxygénation, qui ont permis/favorisé son apparition. Ces conditions doivent être, en général, conservées jusqu'à aujourd'hui. En ce qui concerne la division auto-renouvelante, une fois activée, elle devrait s'appuyer sur l'expression des gènes strictement nécessaires à la régulation simple du cycle cellulaire anaérobie (faible énergie) et à la survie. Cette partie du génome que nous avons considérée comme « le génome eucaryote essentiel minimal » ne devrait pas être beaucoup modifiée du dernier ancêtre commun eucaryote jusqu'à l'humain. Le métabolisme des CS est étroitement régulé par l'ensemble de diverses voies de signalisation, ainsi que de régulateurs génétiques et épigénétiques conservés au cours de l'évolution. Par exemple, les voies de signalisation comme Wnt, NOTCH, TGFβ et MAP kinases, apparues chez les protistes, servent toujours dans les cellules de mammifères et sont liées à la capacité souche (A. Wilson et al., 2004). La création de mécanisme intrinsèque aux CS qui implique des voies moléculaires, de signalisation et métabolique permet leur maintien. En revanche, l'apparition de gènes spécifiques à une espèce est associée à un mode de vie particulier et à la différenciation cellulaire des protistes, qui est un modèle de la différenciation des CS chez les métazoaires. En fait, pour perpétuer la lignée protiste, il fallait revenir à un état indifférencié. Ces gènes permettent donc en fait une coexistence du principe d'auto-renouvellement et de différenciation.

A la fin de cette discussion, vous trouverez 1 tableau récapitulatif et 3 MAPS synthétisant les gènes et les enzymes retrouvées différentiellement exprimées dans le transcriptome protéome, ainsi que les métabolites accumulés ou consommés.

1. MAP ANO vs 3% d'O₂
2. MAP AA vs 3% d'O₂
3. MAP AA vs ANO

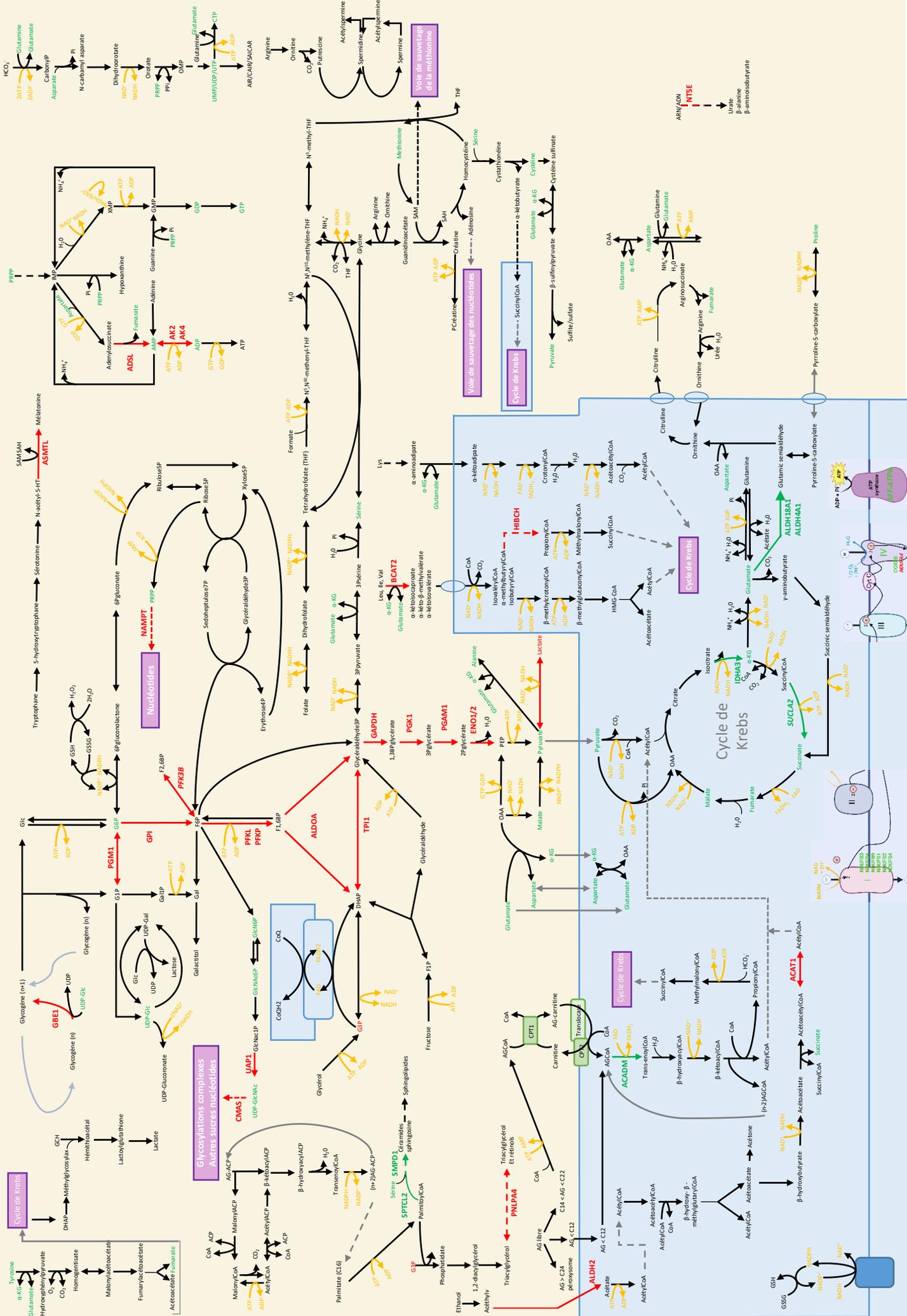
ROUGE : Sur exexpression ou accumulation

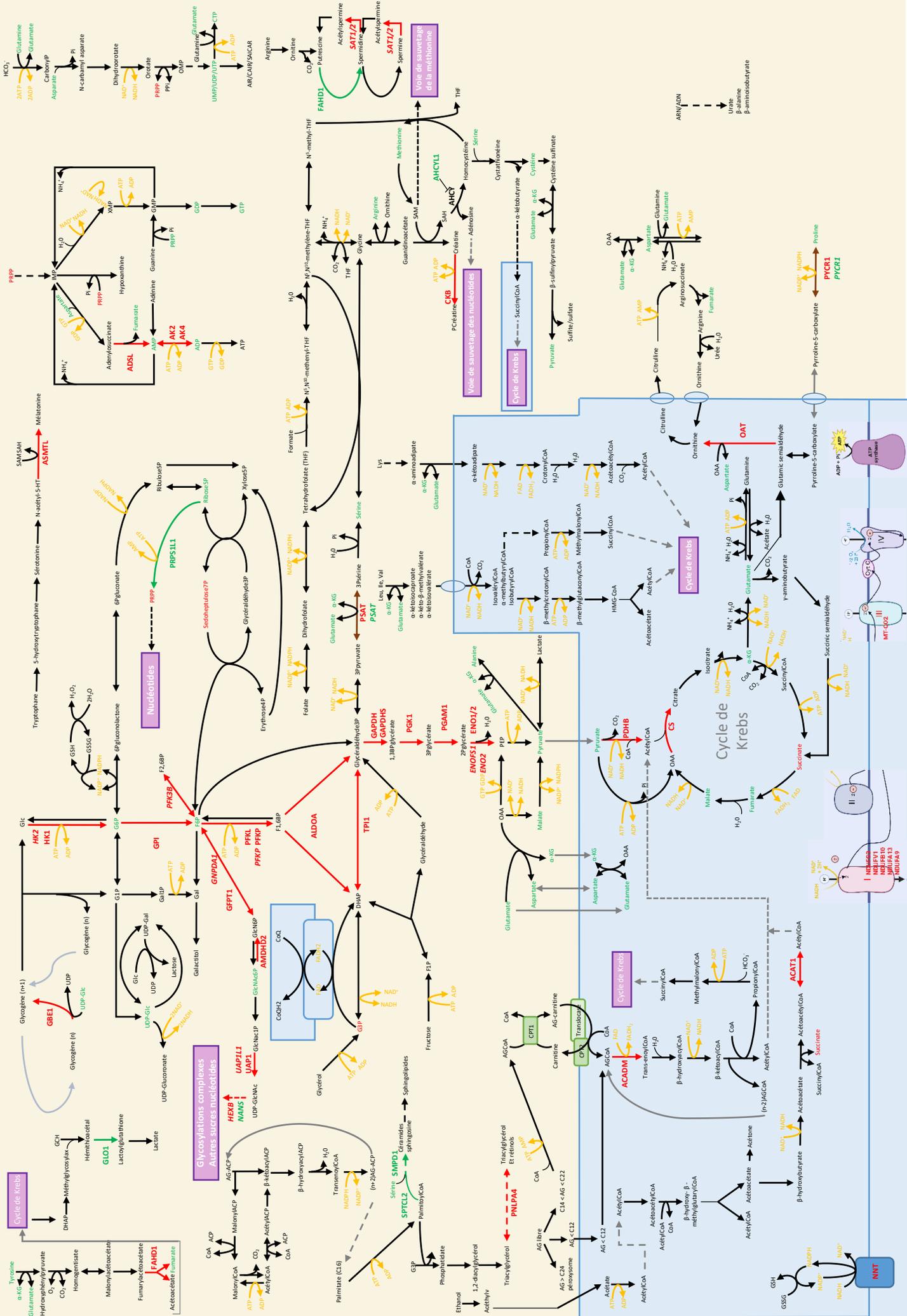
VERT : sous-expression ou consommation

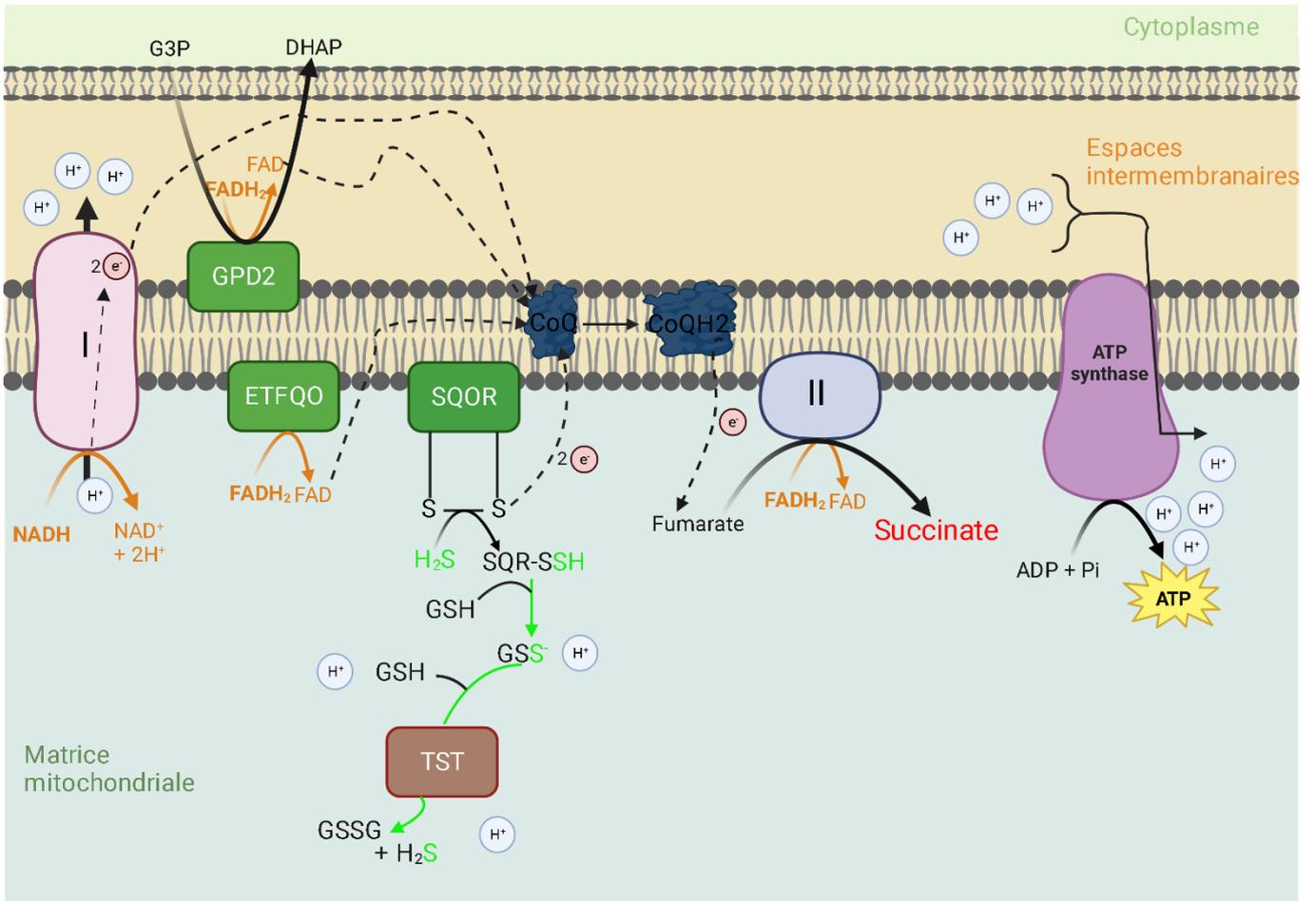
4. Modèle proposée sur le transfert des électrons à la CRM et l'établissement du potentiel de membrane nécessaire à la formation d'ATP en AA.

TABLEAU RECAPITULATIF

voies biochimiques	Profils métaboliques	
	AA	Ano
Réponse à la basse concentration en O ₂	Enzymes dont l'expression est principalement régulée par le facteur de transcription HIF stabilisé	
Dégradation des sucres	Sucres complexes et sucres aminés (glycogène, hexosamines, Mannose)	
Glycolyse	Alimentation de la mitochondrie (PDH)	Fermentation lactique (LDH)
Activité mitochondriale	- Cycle de Krebs → Accumulation de succinate phosphorylation du substrat Utilisation CRM et réduction CoQ→ Cl, respiration fumarique, métabolisme du H ₂ S, métabolisme du G3P, EFT-OQ	
β-oxydation	Mitochondriale Alimentation du cycle de Krebs	Péroxydomale Alimentation de la néoglucogenèse
Métabolisme des acides aminés	Augmentation du métabolisme des acides aminés - Cycle de Krebs (Asp, Pro, Leu, Ile, Val, Lys, Glut) - Métabolisme H ₂ S (Ser et Cys) Consommation d'acides aminés	Consommation des acides aminés permettant d'alimenter la glycolyse pour la néoglucogenèse Consommation d'acides aminés
Métabolisme des co-enzymes et co-facteurs	Cycle de Krebs (FAD, NAD, Acide lipoïque) Métabolisme des nucléotides Glycolyse	Métabolisme des nucléotides Pentoses Phosphates Fermentation lactique







CONCLUSION

Les travaux de cette thèse ont montré que les populations de cellules stromales mésenchymateuses et hématopoïétiques CD34⁺, à la différence des cellules différenciées, possèdent la capacité de s'expanser en anoxie et de se maintenir dans des conditions mimant l'ischémie. Les analyses fonctionnelles ont montré que les populations de cellules capables de s'adapter sont enrichies en CS dans les conditions limitantes (ANO et AA).

L'ensemble de ces résultats, montre que le facteur limitant des cultures de CS de MO n'est pas l'O₂ mais le glucose. Les cellules prolifèrent, certes, mais une augmentation significative de l'apoptose dans cette condition entraîne non pas une amplification mais un maintien de ces cellules.

Les résultats obtenus montrent que l'expansion en anoxie et la survie en AA est basée en partie sur le métabolisme des corps cétoniques, des nucléotides, la dégradation des acides aminés et la glycolyse mais cette dernière présente des destins différents selon la condition. En anoxie le pyruvate produit par la glycolyse est transformé en lactate, alors que dans la condition d'AA, il est transféré dans la mitochondrie pour y être transformé en acétylCoA. Ceci est particulièrement dû au fait que les mitochondries sont moins actives dans la condition d'anoxie, maintenant simplement le potentiel de membrane mitochondrial- pour soutenir l'homéostasie cellulaire. De ce fait le métabolisme des AG se déroule essentiellement dans le péroxysome. L'orientation des voies métaboliques entraînent une accumulation de trois métabolites en particulier, le lactate, l'orotate et le G3P.

Dans notre modèle d'AA, nous avons mis en évidence que la survie sans O₂ et sans glucose induit une reprogrammation métabolique, intégrant une activité mitochondriale en mode anaérobie associée à une activation du cycle de Krebs et au transfert d'électrons par la CRM de manière inverse. Les analyses métaboliques ont mis en évidence une accumulation significative de succinate dans cette condition. Ceci est dû en partie à une inversion du sens réactionnel de la succinate déshydrogénase, qui à son tour est entraîné par le débordement de fumarate provenant de la dégradation des nucléotides puriques et par une activité de navette malate-aspartate. Cependant, les principales voies contribuant à l'accumulation de succinate comprennent la stimulation du glucose/pyruvate induit par le glycogène, ainsi que le métabolisme du corps cétonique, des acides gras, acides aminés et du propanoate qui fournissent du succinate converti en succinyl-CoA dans la réaction générée par l'énergie au niveau du substrat. De plus, la survie à l'ischémie CStroM est liée au métabolisme des sulfures, détecté par une augmentation de l'activité de la sulfure quinone oxydoréductase (SQOR) et de la thiosulfate sulfurtransférase (TST) ainsi que par la consommation de H₂S. La réaction réverse du CII est rendue possible par un ensemble de déshydrogénases de la membrane mitochondriale permettant la

réduction de la CoQ. De plus, le CI semble également jouer un rôle important, permettant le pompage des protons et l'utilisation du potentiel de membrane ainsi créé pour faire fonctionner l'ATP synthase et produire de l'ATP.

Nos résultats mettent en évidence une grande flexibilité métabolique des CStroM et cellules CD34⁺, utilisant des voies métaboliques conservées provenant des premiers organismes eucaryotes qui vivaient dans des océans anoxiques riches en sulfides.

En ce qui concerne les perspectives, il serait intéressant d'effectuer des analyses supplémentaires métabolomiques ciblées avec des marquages isotopiques suivies d'analyses de chromatographie liquide couplée à une analyse par spectrométrie de masse. Nous pourrions ainsi déterminer de manière précise dans quelle proportion un métabolite alimente les voies métaboliques différemment exprimées dans nos analyses. De plus, des études de l'état d'oxydoréduction du CoQ, pourrait confirmer notre modèle. Des études de prolifération et de métabolisme avec la technologie Seahorse sur des populations de CStroM mutées pour certaines enzymes des voies mises en évidence par l'étude de cette thèse. Nous pouvons par exemple nous intéresser plus en détail à la production enzymatique du H₂S en mutant les enzymes de production endogène, CBS et CSE.

Enfin, il serait intéressant d'effectuer des études *in vivo*, sur des modèles de souris ou rats présentant des zones ischémiques à la suite d'un infarctus et de tester des cultures de cellules *ex vivo* en AA, et en présence ou non de H₂S. L'exploitation de ce conditionnement *ex vivo* dans des conditions imitant l'ischémie pourrait être une stratégie pour améliorer la survie des CStroM implantées dans les tissus hypoxiques/ischémiques.

PROJETS DE RECHERCHES ASSOCIES A LA THESE

Articles :

1. Functional single-cell analysis of mesenchymal stromal cells with respect to the expression of aldehyde dehydrogenase and the mitochondrial ROS content – Cytothérapie 2024 - **Article premier auteur en revision**

2. **Article premier auteur en préparation – Article reprenant l'ensemble des travaux de cette thèse**

3. Regulatory Crosstalk between Physiological Low O₂ Concentration and Notch Pathway in Early Erythropoiesis – Biomolecules 2022 - **Article publié – Co-auteur (Annexe)**

4. Meeting report of the 4th biennial Metabolism and Cancer symposium – **Article publié – Co-auteur (Annexe)**

5. Metabolic strategy enabling surviving in ischemia reperfusion in regenerative medicine purposes – **Revue en preparation**

Articles en collaboration :

6. Ergothioneine boosts NAD⁺ in a CSE/H₂S/GPDH-persulfidation -dependent manner to improve healthspan of aging animals – **En collaboration avec l'équipe Sulfaging de Milos Filipovic DR, PhD – En cours de préparation**

7. **Article en collaboration avec l'équipe Biotis de Hélène Bœuf DR, PhD – En cours de préparation**

ANNEXES

Analyse transcriptomique des CStrom issues des cultures en AA, ANO et à 3% d'O₂

ANO vs 3% d'O₂

A.

Term	Count	%	Pvalue	Genes	List total	Pop hits	Pop total	Fold enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
Voie de signalisation du récepteur de lectine de type C	3	7.14	0.026	1960, 4776, 1959	22	104	8644	11.33	0.83	0.85	0.85
Voie de signalisation Apelin	3	7.14	0.044	8862, 10365, 1958	22	139	8644	8.48	0.95	0.85	0.85
Contrainte de cisaillement des fluides et athérosclérose	3	7.14	0.044	1843, 10365, 1728	22	139	8644	8.48	0.95	0.85	0.85
Hépatite B	3	7.14	0.058	1960, 4776, 1959	22	162	8644	7.28	0.98	0.85	0.85
Voies métaboliques	8	19.05	0.066	4509, 768, 64900, 1728, 56901, 10135, 8705, 5209	22	1546	8644	2.03	0.99	0.85	0.85
Cardiomyopathie diabétique	3	7.14	0.086	4509, 5165, 56901	22	203	8644	5.81	1.00	0.85	0.85

B.

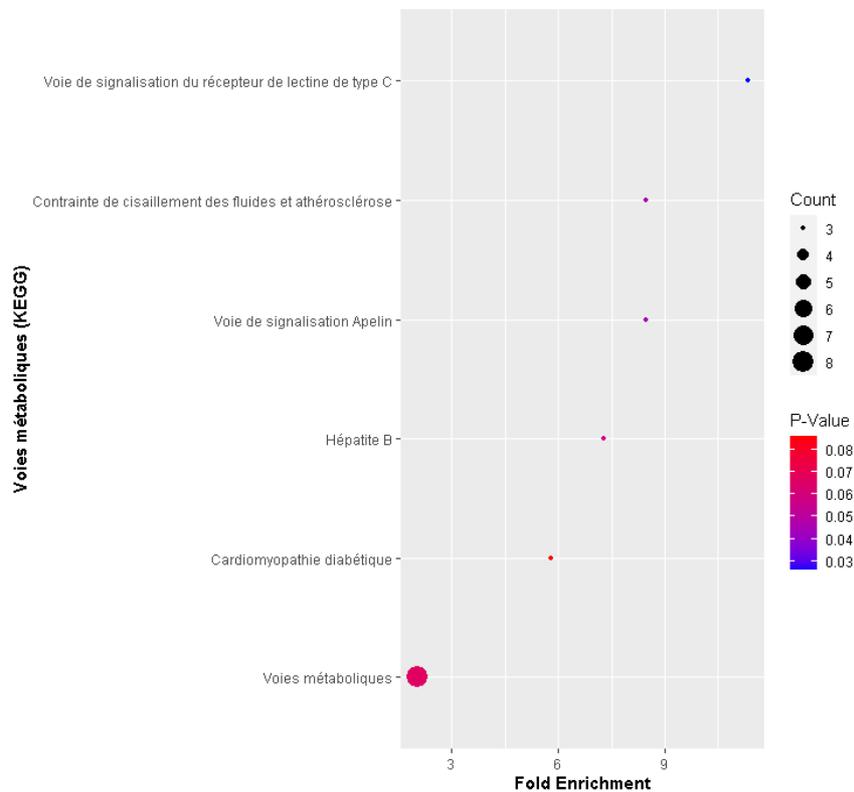


Figure 60/Annexe 1. Tableau des résultats d'enrichissement pour le transcriptome des CStrom incubés en ANO et à 3% d'O₂. A. Dans un premier temps une analyse statistiques a été menée pour identifier les gènes différentiellement exprimés pour la condition d'anoxie par rapport à la condition contrôlée de 3% d'O₂ (Log2FC compris en -0,6 et 0,6 et Pvalue < 0.06). Par la suite la liste des gènes différentiellement exprimés est classée par rapport à leur implication dans les différentes voies métaboliques KEGG. Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel DAVID. B. Représentation graphique Dotplot du tableau présenté en A.

AA vs 3% d'O₂

A.

Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hits	Pop Total	FoldEnrichment	Bonferro	Benjamin	FDR
Voies métaboliques	51	14.05	6.15E-04	9588, 91373, 2548, 2026, 51005, 5214, 6303, 8801, 3712, 10135, 97, 374378, 1593, 3099, 259307, 445, 645, 4697, 119391, 768, 112483, 56901, 11238, 160428, 221823, 9446, 290, 80339, 29968, 10558, 771, 56953, 51020, 5831, 6723, 8705, 10797, 5096, 3990, 4122, 3074, 10007, 54187, 57134, 253782, 55556, 2531, 1728, 4758, 10402, 5209	181	1546	8644	2	0.15	0.06	0.05
Infection par le virus du papillome humain	13	3.58	4.35E-02	3691, 8325, 6696, 7422, 7248, 7148, 1019, 3914, 51384, 284217, 3909, 9636,	181	331	8644	2	1.00	0.50	0.49
Voie de signalisation MAPK	12	3.31	4.96E-02	4915, 1843, 3315, 773, 7422, 3553, 7423, 3643, 1848, 1847, 3480, 3725	181	301	8644	2	1.00	0.51	0.50
Voie de signalisation PI3K-Akt	17	4.68	3.29E-03	3691, 6696, 9623, 7422, 7248, 7148, 7423, 2791, 3480, 9470, 1019, 3914, 4911	181	359	8644	2	0.59	0.15	0.15
Voie de signalisation du calcium	12	3.31	1.66E-02	4915, 57118, 2149, 773, 3708, 7422, 4485, 93129, 7423, 4776, 3710, 55283	181	253	8644	2	0.99	0.36	0.35
Voie de signalisation Apelin	7	1.93	7.00E-02	6696, 3708, 8862, 2791, 3710, 5327, 1958	181	139	8644	2	1.00	0.70	0.68
hsa04141:Protein processing in endoplasmic reticulum	9	2.48	2.55E-02	7494, 6396, 57134, 10483, 56681, 6745, 25956, 3309, 51726	181	170	8644	3	1.00	0.40	0.39
Adhésion focale	12	3.31	3.39E-03	3914, 3691, 6696, 3611, 7422, 284217, 3909, 7148, 2013, 7423, 3480, 3725	181	203	8644	3	0.60	0.15	0.15
Métabolisme du carbone	7	1.93	3.27E-02	5096, 221823, 2026, 5214, 3099, 8801, 29968	181	115	8644	3	1.00	0.45	0.44
Voie de signalisation mTOR	10	2.75	5.22E-03	51384, 64121, 6396, 8325, 7248, 96459, 3643, 58528, 3480, 9470	181	156	8644	3	0.76	0.18	0.17
Polyarthrite rhumatoïde	6	1.65	4.44E-02	1514, 1513, 6364, 7422, 3553, 3725	181	93	8644	3	1.00	0.50	0.49
Voie de signalisation du récepteur de lectine de type C	7	1.93	2.12E-02	3708, 1960, 3553, 4776, 1959, 3710, 3725	181	104	8644	3	1.00	0.36	0.35
Interaction ECM-récepteur	6	1.65	3.78E-02	3914, 3691, 6696, 6696, 284217, 3909, 7148	181	89	8644	3	1.00	0.48	0.47
Lysosome	9	2.48	6.22E-03	2548, 1514, 1513, 2760, 4864, 3482, 3074, 4758, 10577	181	132	8644	3	0.81	0.19	0.18
Voie de signalisation AGE-RAGE dans les complications d	7	1.93	1.78E-02	1019, 7422, 3553, 7412, 7423, 1958, 3725	181	100	8644	3	0.99	0.36	0.35
Voie de signalisation HIF-1	8	2.20	7.57E-03	7422, 2026, 5214, 3099, 3643, 3480, 5209, 9470	181	109	8644	4	0.87	0.20	0.20
Sécrétion GnRH	5	1.38	4.40E-02	57657, 6696, 3708, 2550, 3710	181	64	8644	4	1.00	0.50	0.49
Contrainte de cisaillement des fluides et athérosclérose	11	3.03	6.26E-04	1514, 1843, 7422, 445, 3553, 7412, 9446, 119391, 1728, 5327, 3725	181	139	8644	4	0.15	0.06	0.05
Biosynthèse des acides aminés	6	1.65	1.98E-02	221823, 2026, 445, 5214, 5831, 29968	181	75	8644	4	1.00	0.36	0.35
Métabolisme de l'arginine et de la proline	4	1.10	8.55E-02	5831, 6303, 112483, 6723	181	50	8644	4	1.00	0.82	0.80
Métabolisme du glutathion	5	1.38	3.05E-02	9588, 9446, 119391, 290, 6723	181	57	8644	4	1.00	0.45	0.44
Métabolisme du cholestérol	5	1.38	2.12E-02	3990, 1593, 4864, 51129, 10577	181	51	8644	5	1.00	0.36	0.35
Métabolisme des sphingolipides	6	1.65	5.13E-03	10558, 253782, 2531, 2760, 3074, 4758	181	54	8644	5	0.75	0.18	0.17
Métabolisme du fructose et du mannose	4	1.10	3.31E-02	55556, 5214, 3099, 5209	181	34	8644	6	1.00	0.45	0.44
Métabolisme des sucres aminés et des sucres nucléotid	6	1.65	3.36E-03	10007, 54187, 51005, 3099, 3074, 91373	181	49	8644	6	0.60	0.15	0.15
Absorption minérale	8	2.20	2.30E-04	4493, 4494, 4495, 4499, 4489, 4501, 645745, 4490	181	60	8644	6	0.06	0.06	0.05
Export de protéines	4	1.10	1.16E-02	60559, 58477, 90701, 3309	181	23	8644	8	0.96	0.28	0.28
Métabolisme de l'azote	3	0.83	4.78E-02	771, 768, 11238	181	17	8644	8	1.00	0.51	0.50

B.

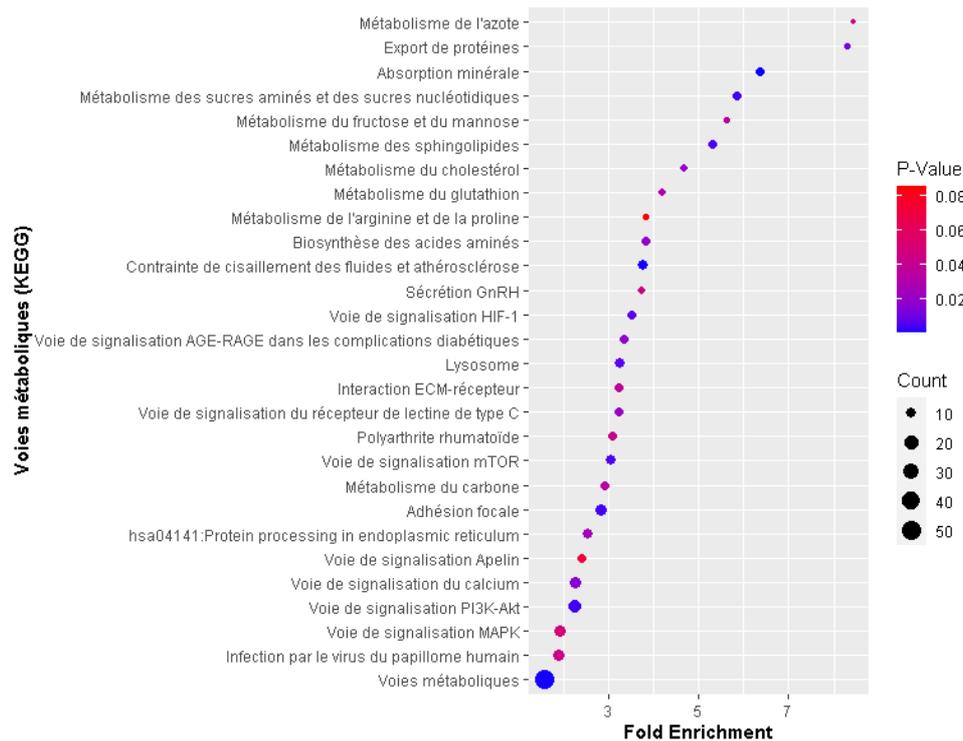


Figure 61/Annexe 2. Tableau des résultats d'enrichissement pour le transcriptome des CStroM incubés en AA et à 3% d'O₂. A. Dans un premier temps une analyse statistiques a été mené pour identifier les gènes différentiellement exprimé pour la condition d'AA par rapport à la condition contrôle de 3% d'O₂ (Log2FC compris en -0,6 et 0,6 et Pvalue < 0.06). Par la suite la liste des gènes différentiellement exprimés est classé par rapport à leur implication dans les différentes voies métaboliques KEGG. Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel DAVID. B. Représentation graphique Dotplot du tableau présenté en A.

AA vs ANO

A.

Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR	
Voies métaboliques	15	15.151515	4.40E-02	6241, 9446, 3074, 10007, 259307, 57134, 253782, 2531, 57016, 51005, 8869, 427, 8801, 97, 4758	50	1546	8644		2	1.00	0.72	0.72
Lipides et athérosclérose	5	5.0505051	3.30E-02	7494, 596, 3708, 23643, 3309	50	215	8644		4	1.00	0.59	0.59
Autophagie - animal	4	4.040404	6.65E-02	1514, 596, 3708, 58528	50	165	8644		4	1.00	0.76	0.76
Syndrome de Cushing	4	4.040404	5.72E-02	1019, 51384, 3708, 3710	50	155	8644		4	1.00	0.75	0.75
Traitement des protéines dans le RE	5	5.0505051	1.54E-02	7494, 596, 57134, 3309, 51726	50	170	8644		5	0.94	0.46	0.46
Interaction ECM-récepteur	3	3.030303	9.03E-02	6696, 284217, 3909	50	89	8644		6	1.00	0.90	0.90
Toxoplasmose	4	4.040404	2.48E-02	596, 284217, 3909, 23643	50	111	8644		6	0.99	0.56	0.56
Apoptoses	5	5.0505051	7.18E-03	1514, 596, 3708, 3710, 8739	50	136	8644		6	0.73	0.38	0.38
Synthèse, sécrétion et action de l'hormone parathyroïdienne	4	4.040404	2.20E-02	596, 3708, 4324, 3710	50	106	8644		7	0.98	0.56	0.56
Synthèse des hormones thyroïdiennes	3	3.030303	6.73E-02	3708, 3710, 3309	50	75	8644		7	1.00	0.76	0.76
Cancer du poumon à petites cellules	4	4.040404	1.51E-02	1019, 596, 284217, 3909	50	92	8644		8	0.94	0.46	0.46
Sécrétion de rénine	3	3.030303	5.81E-02	3708, 358, 3710	50	69	8644		8	1.00	0.75	0.75
Lysosome	6	6.0606061	8.56E-04	1514, 427, 4864, 3074, 4758, 10	50	132	8644		8	0.14	0.08	0.08
Sécrétion GnRH	3	3.030303	5.08E-02	6696, 3708, 3710	50	64	8644		8	1.00	0.75	0.75
Voie de signalisation p53	4	4.040404	8.37E-03	6241, 1019, 596, 55240	50	74	8644		9	0.78	0.38	0.38
Métabolisme des sucres aminés et des sucres nucléotidiques	3	3.030303	3.13E-02	10007, 51005, 3074	50	49	8644		11	1.00	0.59	0.59
Métabolisme des sphingolipides	5	5.0505051	2.34E-04	253782, 2531, 427, 3074, 4758	50	54	8644		16	0.04	0.04	0.04
Autre dégradation des glycanes	2	2.020202	9.74E-02	3074, 4758	50	18	8644		19	1.00	0.92	0.92
Biosynthèse des glycosphingolipides - série ganglio	2	2.020202	8.18E-02	8869, 3074	50	15	8644		23	1.00	0.87	0.87

B.

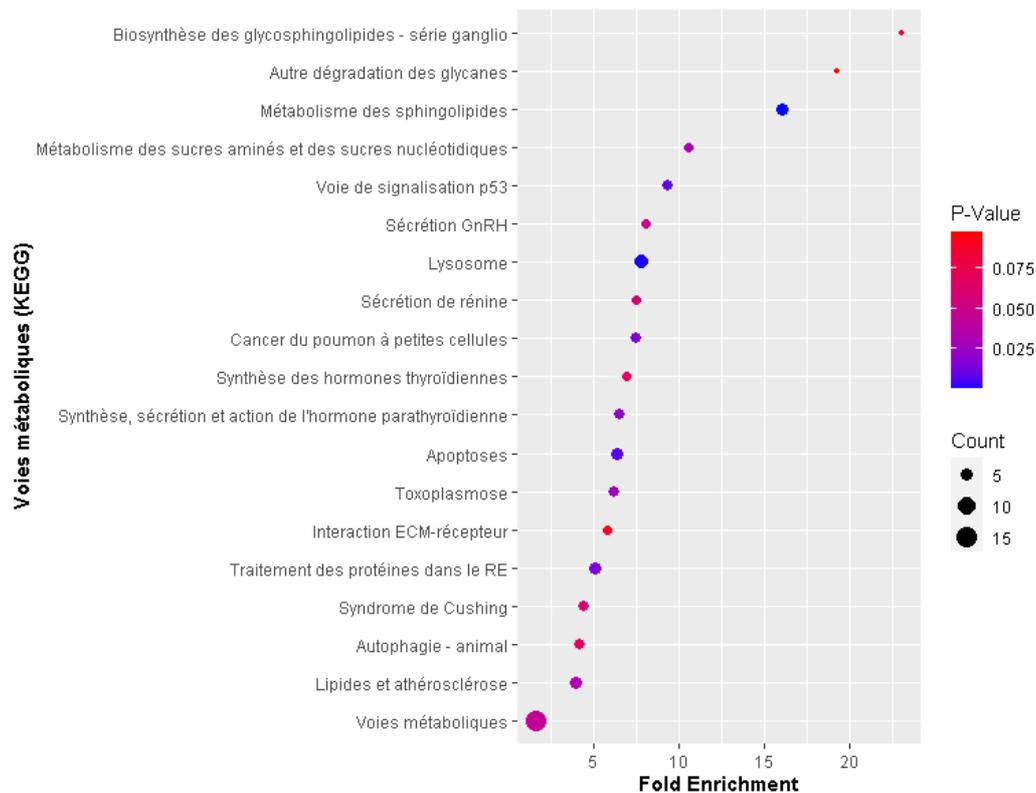


Figure 62/Annexe 3. Tableau des résultats d'enrichissement pour le transcriptome des CStroM incubés en AA et à ANO.

A. Dans un premier temps une analyse statistique a été menée pour identifier les gènes différentiellement exprimés pour la condition d'AA par rapport à la condition contrôlée de 3% d'O₂ (Log2FC compris en -0,6 et 0,6 et Pvalue < 0.06). Par la suite la liste des gènes différentiellement exprimés est classé par rapport à leur implication dans les différentes voies métaboliques KEGG. Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel DAVID. B. Représentation graphique Dotplot du tableau présenté en A.

Analyse protéomique des CStrom issues des cultures en AA, ANO et à 3% d'O₂

ANO vs 3% d'O₂

A.

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	geneID	Count
GO:0009150	processus métabolique des acides aminés à chaîne ramifiée	0.02	20/17913	4.59E-05	1.27E-03	1.07E-03	ACAT1/HIBCH/HSD17B10/BAT2	4
GO:0006735	processus catabolique des acides aminés à chaîne ramifiée	0.02	20/17913	4.59E-05	1.27E-03	1.07E-03	ACAT1/HIBCH/HSD17B10/BAT2	4
GO:0019674	transport d'électrons mitochondriaux, NADH vers ubiquino	0.03	55/17913	2.07E-05	6.35E-04	5.38E-04	NDUFS2/NDUF84/NDUF89/NDUFS1/NDUF83/NDUFS4	6
GO:0019320	allongement translationnel mitochondrial	0.03	86/17913	2.58E-04	6.57E-03	5.57E-03	MRPL38/MRPL13/MRPL4/MRPL49/MRPL45/MRPL17	6
GO:0046031	oxydation des acides gras	0.03	93/17913	3.94E-04	9.50E-03	8.05E-03	ACAA1/HSD17B4/DECR1/ACADM/GCDH/APPL2	6
GO:0006096	Assemblage du complexe NADH déshydrogénase	0.04	64/17913	4.08E-06	1.31E-04	1.11E-04	NDUFS2/TIMMDC1/NDUF84/NDUF89/NDUFS1/NDUF83/NDUFS4	7
GO:0042866	Ensemble I du complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale	0.04	64/17913	4.08E-06	1.31E-04	1.11E-04	NDUFS2/TIMMDC1/NDUF84/NDUF89/NDUFS1/NDUF83/NDUFS4	7
GO:0019362	synthèse d'ATP mitochondriale couplée à des électrons trans	0.04	89/17913	3.65E-05	1.06E-03	8.98E-04	NDUFS2/NDUF84/NDUF89/COXS8/NDUFS1/NDUF83/NDUFS4	7
GO:0006732	Transport d'électrons couplé à la synthèse d'ATP	0.04	90/17913	3.92E-05	1.12E-03	9.45E-04	NDUFS2/NDUF84/NDUF89/COXS8/NDUFS1/NDUF83/NDUFS4	7
GO:0009108	chaîne de transport d'électrons respiratoire	0.04	106/17913	1.11E-04	2.95E-03	2.50E-03	NDUFS2/NDUF84/NDUF89/COXS8/NDUFS1/NDUF83/NDUFS4	7
GO:0051188	expression des gènes mitochondriaux	0.04	148/17913	1.48E-04	3.87E-03	3.28E-03	MRPL38/MRPL13/MRPL4/MRPL49/HSD17B10/MRPL45/MRPL17/PNPT1	8
GO:0006094	gluconéogenèse	0.05	86/17913	2.44E-07	9.15E-06	7.75E-06	PGK1/ALDOA/ENO2/PGAM1/TP11/GAPDH/ENO1/GPI/PGM1	9
GO:0006520	démontage du complexe protéique cellulaire	0.05	195/17913	1.90E-04	4.93E-03	4.18E-03	SPTBN1/SPTAN1/MRPL38/MRPL13/MRPL4/MRPL49/MAP1B/MRPL45/MRPL17	9
GO:0045333	Régénération NADH	0.05	27/17913	7.42E-14	2.50E-11	2.12E-11	PFKP/PGK1/PFKL/ALDOA/ENO2/PGAM1/TP11/GAPDH/ENO1/GPI	10
GO:0070482	processus métabolique des acides alpha-aminés	0.05	200/17913	4.27E-05	1.20E-03	1.02E-03	SARS/ALDH4A1/ASNS/ACAT1/HIBCH/ALDH18A1/GCDH/BAT2/CKB/ERO1A	10
GO:0015980	processus catabolique de l'hexose	0.06	55/17913	8.04E-12	9.87E-10	8.36E-10	PFKP/PGK1/PFKL/ALDOA/ENO2/PGAM1/TP11/GAPDH/ENO1/GPI/PGM1	11
GO:0010257	respiration cellulaire	0.06	176/17913	2.10E-06	7.26E-05	6.15E-05	NDUFB3/NDUFS4/ADSL/PNPT1	11
GO:0032981	Processus métabolique du NAD	0.07	71/17913	7.27E-12	9.82E-10	8.32E-10	PFKP/PGK1/PFKL/ALDOA/ENO2/PGAM1/TP11/NAMPT/GAPDH/ENO1/NTSE/GPI	12
GO:0006120	processus glycolytique	0.07	110/17913	1.03E-10	8.70E-09	7.37E-09	PFKP/PGK1/PFKL/ALDOA/ENO2/PGAM1/TP11/LDHA/GAPDH/NUP93/ENO1/GPI/PGM1	13
GO:0042775	processus de biosynthèse du pyruvate	0.07	114/17913	1.62E-10	1.29E-08	1.09E-08	PFKP/PGK1/PFKL/ALDOA/ENO2/PGAM1/TP11/LDHA/GAPDH/NUP93/ENO1/GPI/PGM1	13
GO:0042773	dérivation d'énergie par oxydation d'un composé organique	0.07	264/17913	3.52E-06	1.18E-04	1.00E-04	NDUFS2/NDUF84/SUCLA2/GBE1/NDUF89/DH3A/COXS8/NDUFS1/NDUFB3/NDUFS4/ADSL/PGM1/PNPT1	13
GO:1901605	Processus métabolique de l'ADP	0.08	121/17913	2.57E-11	2.78E-09	2.35E-09	AK4/PPKP/PGK1/PFKL/ALDOA/ENO2/PGAM1/TP11/LDHA/GAPDH/NUP93/ENO1/GPI/PGM1	14
GO:0009081	processus métabolique des nucléotides pyridine	0.08	179/17913	5.05E-10	3.03E-08	2.57E-08	PFKP/PGK1/PFKL/ALDOA/ENO2/PGAM1/TP11/LDHA/NAMPT/GAPDH/NUP93/ENO1/NTSE/GPI/PGM1	15
GO:0009083	processus de biosynthèse de coenzyme	0.09	245/17913	5.03E-09	2.16E-07	1.83E-07	PFKP/PGK1/PFKL/ALDOA/ENO2/PGAM1/TP11/ACAT1/LDHA/GCDH/NAMPT/GAPDH/NUP93/ENO1/GPI/PGM1	16
GO:0022904	processus métabolique des acides aminés cellulaires	0.09	347/17913	6.17E-07	2.22E-05	1.88E-05	SARS/PSMD9/ALDH4A1/ASNS/PCYOX1/PSMCS/ACAT1/HIBCH/ALDH18A1/GCDH/PSMA2/PSMC2/HSD17B10/BAT2/CKB/ERO1A	16
GO:0140053	réponse aux niveaux d'oxygène	0.09	389/17913	2.74E-06	9.38E-05	7.95E-05	PGK1/STUB1/NDRG1/PSMD9/PSMCS/CAV1/PSMA2/PSMC2/NAMPT/TMBIM6/TBL2/ENO1/TM9SF4/ADSL/MMP14/ERO1A	16
GO:0043624	processus de biosynthèse du cofacteur	0.09	310/17913	2.23E-08	8.86E-07	7.51E-07	PFKP/PGK1/PFKL/ALDOA/ENO2/PGAM1/SUCLA2/TP11/ACAT1/LDHA/GCDH/NAMPT/GAPDH/NUP93/ENO1/GPI/PGM1	17
GO:0070125	processus métabolique du coenzyme	0.11	366/17913	1.26E-09	6.44E-08	5.46E-08	PFKP/PGK1/PFKL/ALDOA/ENO2/PGAM1/SUCLA2/HSD17B4/TP11/ACAT1/LDHA/GCDH/NAMPT/CYB5R3/GAPDH/NUP93/ENO1/NTSE/GPI/PGM1	20
GO:0019395	processus métabolique des ribonucléotides puriques	0.16	500/17913	5.10E-15	1.38E-11	1.17E-11	AK4/PPKP/PGK1/NDUFS2/PFKL/ALDOA/NDUF84/ENO2/PGAM1/SUCLA2/HSD17B4/TP11/ACAT1/GTBP1/LDHA/NDUF89/NUDT16/COXS8/GCDH/NDUFS1/NDUF83/MSH2/GAPDH/NUP93/ENO1/NDUFS4/ADSL/NTSE/GPI/PGM1	30

B.

Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
Voies métaboliques	47	24.48	8.36E-08	7167, 8991, 5223, 6675, 2821, 55821, 158, 3939, 4709, 4907, 26275, 2026, 4048, 5214, 9517, 5236, 8803, 4720, 5832, 10135, 30, 4724, 3419, 4282, 131870, 34, 5230, 55907, 5211, 38, 8623, 2023, 1152, 3295, 440, 4719, 2632, 587, 3028, 226, 2597, 205, 8659, 4710, 2639, 1329, 4715	121	1546	8644	2	0.000	0.000	0.000
Voies de neurodégénérescence – maladies multiples	18	9.38	2.88E-04	5683, 292, 84617, 51164, 4719, 4709, 3028, 5578, 4720, 5534, 4710, 7846, 5701, 4724, 1329, 5715, 5705, 4715	121	476	8644	3	0.063	0.006	0.005
Endocytose	10	5.21	7.88E-03	1601, 10938, 30846, 857, 11311, 161, 8729, 8737, 1956, 55040	121	250	8644	3	0.830	0.098	0.089
Cancérogenèse chimique - espèces réactives de l'oxygène	9	4.69	1.23E-02	4719, 4709, 4720, 4710, 292, 4724, 1329, 1956, 4715	121	223	8644	3	0.937	0.131	0.119
Ribosome	7	3.65	2.85E-02	51073, 200916, 25873, 28998, 63875, 6192, 6181, 5683, 9688, 84617, 51164, 4719, 4709, 4720, 5534, 5683, 292, 84617, 4719, 4709, 3028, 2597, 4720, 4710, 2639, 1329, 4715	121	167	8644	3	0.998	0.228	0.208
Sclérose latérale amyotrophique	16	8.33	1.46E-04	5683, 292, 84617, 4719, 4709, 3028, 2597, 4720, 4710, 2639, 1329, 4715	121	364	8644	3	0.032	0.003	0.003
Maladie d'Alzheimer	17	8.85	7.55E-05	5534, 4710, 7846, 5701, 4724, 1329, 5715, 5705, 4715	121	384	8644	3	0.017	0.002	0.002
Voie de signalisation du glucagon	5	2.60	6.13E-02	3939, 5211, 5223, 5214, 5534	121	107	8644	3	1.000	0.429	0.391
Métabolisme des purines	6	3.13	3.25E-02	131870, 4907, 55821, 158, 205, 5236	121	128	8644	3	0.999	0.243	0.221
Signalisation endocannabinoïde rétrograde	7	3.65	1.69E-02	4719, 4709, 4720, 5578, 4710, 4724, 4715	121	148	8644	3	0.978	0.151	0.138
Ataxie spinocérébelleuse	7	3.65	1.44E-02	5683, 10528, 5578, 292, 5701, 5715, 5705	121	143	8644	3	0.962	0.141	0.128
Cardiomyopathie diabétique	10	5.21	2.01E-03	4719, 4709, 2597, 4720, 5578, 4710, 292, 4724, 1329, 4715	121	203	8644	4	0.362	0.032	0.029
Stéatose hépatique non alcoolique	8	4.17	5.71E-03	4719, 4709, 4720, 4710, 4724, 8737, 1329, 4715	121	155	8644	4	0.723	0.075	0.069
OXPPOS	7	3.65	1.07E-02	4719, 4709, 4720, 4710, 4724, 1329, 4715	121	134	8644	4	0.911	0.127	0.115
Maladie de Huntington	16	8.33	2.00E-05	5683, 292, 161, 84617, 51164, 4719, 4709, 4720, 4710, 7846, 5701, 4724, 1329, 5715, 5705, 4715	121	306	8644	4	0.004	0.001	0.001
Maladie de Parkinson	14	7.29	7.67E-05	5683, 292, 84617, 4719, 4709, 4720, 4710, 7846, 5701, 4724, 1329, 5715, 5705, 4715	121	266	8644	4	0.017	0.002	0.002
Maladie de prions	16	8.33	4.87E-06	857, 5701, 4724, 1329, 5715, 5705, 4715	121	272	8644	4	0.001	0.000	0.000
Métabolisme des nucléotides	5	2.60	3.02E-02	131870, 4907, 158, 8623, 205	121	85	8644	4	0.999	0.234	0.213
Métabolisme des AG	4	2.08	4.44E-02	34, 38, 3295, 30	121	57	8644	5	1.000	0.321	0.292
Métabolisme central du carbone dans le cancer	5	2.60	1.60E-02	3939, 5211, 5223, 5214, 1956	121	70	8644	5	0.973	0.150	0.136
Dégradation de l'ARN	6	3.13	4.72E-03	131870, 2026, 5211, 2023, 5214, 87178	121	79	8644	5	0.653	0.066	0.060
Métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate	3	1.56	9.30E-02	440, 158, 8659	121	37	8644	6	1.000	0.579	0.527
Métabolisme de l'amidon et du saccharose	3	1.56	8.87E-02	2821, 2632, 5236	121	36	8644	6	1.000	0.568	0.517
Protéasome	4	2.08	2.57E-02	5683, 5701, 5715, 5705	121	46	8644	6	0.997	0.213	0.194
β-oxydation	4	2.08	2.15E-02	34, 38, 30, 2639	121	43	8644	7	0.992	0.185	0.169
Métabolisme du galactose	3	1.56	7.24E-02	5211, 5236, 5214	121	32	8644	7	1.000	0.477	0.434
Métabolisme du propanoate	3	1.56	7.24E-02	3939, 26275, 8803	121	32	8644	7	1.000	0.477	0.434
Voie de signalisation HIF-1	11	5.73	2.45E-06	5230, 3939, 2026, 5211, 226, 2597, 2023, 5214, 7018, 5578, 1956	121	109	8644	7	0.001	0.000	0.000
Métabolisme des sucres aminés et des sucres nucléotidiques	5	2.60	4.62E-03	2821, 55907, 6675, 5236, 1727	121	49	8644	7	0.646	0.066	0.060
Biosynthèse des sucres nucléotidiques	4	2.08	1.44E-02	2821, 55907, 6675, 5236	121	37	8644	8	0.961	0.141	0.128
Métabolisme du fructose et du mannose	4	2.08	1.14E-02	7167, 5211, 226, 5214	121	34	8644	8	0.924	0.128	0.116
Métabolisme du carbone	14	7.29	5.47E-09	5230, 7167, 38, 5211, 5223, 2023, 2821, 26275, 2026, 226, 2597, 5214, 8803, 30	121	115	8644	9	0.000	0.000	0.000
Dégradation de la valine, de la leucine et de l'isoleucine	6	3.13	5.04E-04	34, 3028, 587, 26275, 38, 30	121	48	8644	9	0.107	0.009	0.009
Voie des PP	5	2.60	8.32E-04	2821, 5211, 226, 5236, 5214	121	31	8644	12	0.170	0.014	0.013
Biosynthèse des acides aminés	13	6.77	3.67E-10	5230, 7167, 5211, 5223, 2023, 440, 587, 2026, 226, 2597, 5214, 5832, 3419	121	75	8644	12	0.000	0.000	0.000
Glycolyse/néoglucogenèse	12	6.25	1.55E-09	2821, 5230, 7167, 3939, 2026, 5211, 226, 2597, 5223, 5236, 2023, 5214	121	67	8644	13	0.000	0.000	0.000

Figure 63/Annexe 4. Tableau des résultats d'enrichissement pour le transcriptome des CStrom incubés en ANO et à 3% d'O₂.

A. Dans un premier temps une analyse statistiques a été menée pour identifier les protéines différenciellement exprimées pour la condition d'ANO par rapport à la condition contrôle de 3% d'O₂ (Log2FC compris en -0,6 et 0,6 et Pvalue < 0.06). Par la suite la liste des protéines, différenciellement exprimées, est classée par rapport à leur implication dans les différents processus biologiques « gene ontology » (GO). Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel ProteoRE. B. Tableau de la liste

des protéines, différenciellement exprimées, est classée par rapport à leur implication dans les différentes voies métaboliques KEGG. Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel DAVID.

AA vs 3% d'O₂

A.

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	geneID	Count
GO:006099	Cycle de Krebs	0.02	27/17913	2.33E-04	5.58E-03	4.63E-03	NNT/FAHD1/PDH8/CS	4
GO:0006120	transport d'électrons mitochondriaux, NADH vers CoQ	0.02	55/17913	4.00E-04	8.68E-03	7.20E-03	NDUFA13/NDUF810/NDUFV1/NDUFA9/NDUFS3	5
GO:0009064	Processus métabolique de la glutamine	0.03	68/17913	1.23E-04	3.26E-03	2.70E-03	ASNS/ATP2B4/PHGDH/GFPT1/PYCR1/OAT	6
GO:0008652	processus de biosynthèse cellulaire des acides aminés	0.03	73/17913	1.83E-04	4.65E-03	3.85E-03	ASNS/ATP2B4/PHGDH/PYCR1/PSAT1/OAT	6
GO:0042775	synthèse d'ATP mitochondriale couplée au transport d'électrons	0.03	89/17913	7.01E-05	2.03E-03	1.68E-03	NDUFA13/CDK1/COX2/NDUF810/NDUFV1/NDUFA9/NDUFS3	7
GO:0060071	Voie de signalisation Wnt, voie de polarité cellulaire	0.03	107/17913	2.23E-04	5.46E-03	4.53E-03	AP2A2/DAB2/PSMC2/PSMC5/PTK7/PSMB4/CTHRC1	7
GO:0006094	gluconéogenèse	0.04	86/17913	6.12E-06	2.32E-04	1.93E-04	PGK1/GPI/GAPDH/ALDOA/GAPDH5/TP1/ENO1/ENO2	8
GO:2000058	régulation du catabolisme des protéines dépendant de l'ubiquitine	0.04	137/17913	2.75E-05	8.74E-04	7.25E-04	DAB2/RPL23/BAG6/DDRGK1/RAD23B/STUB1/UBQLN1/PML/UFL1	9
GO:0016241	régulation de la macroautophagie	0.04	166/17913	1.22E-04	3.26E-03	2.70E-03	LAMTOR3/ATP6V1D/MTOR/GAPDH/CDC37/LARP1/SPTLC2/RAB5A/GNAI3	9
GO:0006986	réponse à la protéine dépliée	0.05	161/17913	1.61E-05	5.47E-04	4.53E-04	FAF2/ASNS/TBL2/GFPT1/DNAI1/STUB1/THBS1/DNAI3/DERL2/DNAI1	10
GO:1901605	processus métabolique des acides α-aminés	0.05	200/17913	1.01E-04	2.80E-03	2.32E-03	ASNS/ATP2B4/PHGDH/GFPT1/PYCR1/PAHB/CBK/ACAT1/PSAT1/OAT	10
GO:0006735	Régénération du NADH	0.05	27/17913	3.54E-15	3.82E-12	3.16E-12	PGK1/PFKP/GPI/GAPDH/ALDOA/GAPDH5/TP1/ENO1/ENO2/PFKL/HK1	11
GO:0061718	processus catabolique du glucose en pyruvate	0.05	27/17913	3.54E-15	3.82E-12	3.16E-12	PGK1/PFKP/GPI/GAPDH/ALDOA/GAPDH5/TP1/ENO1/ENO2/PFKL/HK1	11
GO:0006734	Processus métabolique du NADH	0.05	36/17913	1.49E-13	4.48E-11	3.72E-11	PGK1/PFKP/GPI/GAPDH/ALDOA/GAPDH5/TP1/ENO1/ENO2/PFKL/HK1	11
GO:0045333	Respiration cellulaire	0.05	176/17913	5.68E-06	2.18E-04	1.81E-04	NDUFA13/CDK1/COX2/NNT/FAHD1/NDUF810/PDH8/NDUFV1/CS/NDUFA9/NDUFS3	11
GO:1903050	Protéolyse impliquée dans le processus catabolique des protéines	0.06	198/17913	2.92E-06	1.22E-04	1.01E-04	DAB2/PSMC2/PSMC5/RPL23/BAG6/DDRGK1/RAD23B/STUB1/UBQLN1/DERL2/PML/UFL1	12
GO:0010506	Régulation de l'autophagie	0.06	314/17913	2.66E-04	6.06E-03	5.02E-03	LAMTOR3/ATP6V1D/IFI16/MTOR/GAPDH/CDC37/STAT3/LARP1/SPTLC2/RAB5A/GNAI3/EIF4G2	12
GO:0006754	Processus de biosynthèse de l'ATP	0.07	150/17913	1.82E-09	1.36E-07	1.13E-07	PGK1/PFKP/GPI/GAPDH/ALDOA/GAPDH5/STAT3/COX2/TP1/ENO1/ENO2/PFKL/HK1/NUP133	14
GO:0046031	Processus métabolique de l'ADP	0.07	121/17913	7.84E-12	1.62E-09	1.34E-09	PGK1/PFKP/GPI/GAPDH/ALDOA/GAPDH5/STAT3/TP1/ENO1/AKA/AK2/ENO2/PFKL/HK1/NUP133	15
GO:0072525	Processus de biosynthèse d'un composé contenant de la pyridine	0.07	145/17913	1.09E-10	1.33E-08	1.10E-08	PGK1/PFKP/GPI/GAPDH/ALDOA/GAPDH5/STAT3/TP1/ENO1/ENO2/PFKL/HK1/PDXK/PSAT1/NUP133	15
GO:0006090	Processus métabolique du pyruvate	0.07	147/17913	1.32E-10	1.56E-08	1.29E-08	PGK1/PFKP/GPI/GAPDH/ALDOA/GAPDH5/STAT3/TP1/ENO1/ENO2/PFKL/PDH/HK1/NUP133/SLC16A1	15
GO:0009132	Processus métabolique du nucléoside diphosphate	0.07	153/17913	2.34E-10	2.49E-08	2.07E-08	PGK1/PFKP/GPI/GAPDH/ALDOA/GAPDH5/STAT3/TP1/ENO1/AKA/AK2/ENO2/PFKL/HK1/NUP133	15
GO:0045862	Régulation positive de la protéolyse	0.07	333/17913	6.70E-06	2.51E-04	2.08E-04	SNX9/DDRGK1/STUB1/CLPX/UBQLN1/PML	15
GO:0034248	Régulation du processus métabolique de l'amide cellulaire	0.07	452/17913	2.18E-04	5.38E-03	4.46E-03	TRMT10C/YTHDF1/EIF4G2/THBS1/DNAI3/ONP1/SLC2A1/	15
GO:0001666	Réponse à l'hypoxie	0.08	354/17913	3.14E-06	1.29E-04	1.07E-04	PGK1/OPA1/MTOR/NDRG1/TBL2/PSMC2/LONP1/SLC2A1/PSMC5/ENO1/PAHB/STUB1/UBQLN1/THBS1/PSMB4/PML	16
GO:0006520	Processus métabolique des acides aminés cellulaires	0.08	347/17913	5.03E-07	2.34E-05	1.94E-05	ASNS/ATP2B4/PSMC2/PHGDH/GFPT1/PSMC5/AIMP1/PYCR1/RARS2/PAHB/CBK/ACAT1/PSAT1/OAT/PSMB4/PCYOX1/WARS	17
GO:0009896	Régulation positive du processus catabolique	0.08	392/17913	2.67E-06	1.13E-04	9.38E-05	NDUFA13/GAPDH5/CDC37/DAB2/EZR/PSMC2/NNT/LARP1/ITCH/PSMC5/SPTLC2/BAG6/SNX9/DDRGK1/GNAI3/STUB1/UBQLN1	17
GO:0031667	Réponse aux niveaux de nutriments	0.08	466/17913	2.56E-05	8.20E-04	6.80E-04	OPA1/IFI16/NUCB2/MTOR/SSH1/ASNS/TBL2/APPL2/MAP1B/SLC2A1/NNT/LARP1/ACAT1/EGFR/GNPAT/UFL1/SLC16A1	17
GO:0034976	Réponse au stress du réticulum endoplasmique	0.09	254/17913	7.59E-10	6.27E-08	5.20E-08	FAF2/OPA1/ASNS/RCN3/TBL2/FLOT1/GFPT1/BAG6/DDRGK1/MAN1B1/PAHB/STUB1/UBQLN1/THBS1/DNAI3/DERL2/PML/UFL1	18
GO:0051188	Processus de biosynthèse du cofacteur	0.09	310/17913	1.76E-08	1.00E-06	8.32E-07	PGK1/PFKP/GPI/GAPDH/ALDOA/GAPDH5/STAT3/COX2/TP1/ENO1/ENO2/PFKL/PDH/HK1/PDXK/ACAT1/PSAT1/NUP133	18
GO:0006732	processus métabolique du coenzyme	0.09	366/17913	2.16E-07	1.04E-05	8.58E-06	PGK1/PFKP/GPI/GAPDH/ALDOA/GAPDH5/STAT3/TP1/ENO1/ENO2/PFKL/CYB5R3/PDH/HK1/PDXK/ACAT1/NUP133	18
GO:0072330	Procédé de biosynthèse de l'acide monocarboxylique	0.09	318/17913	4.34E-09	2.92E-07	2.43E-07	PGK1/PFKP/GPI/GAPDH/ALDOA/MIF/QKI/GAPDH5/ASNS/STAT3/ALDH1A3/TP2B4/NDUFA13/PGK1/PFKP/CDK1/GPI/GAPDH/ALDOA/GAPDH5/STAT3/COX2/TP1/ENO1/AKA/NDUF810/AK2/ENO2/PFKL/HK1/NDUFV1/NDUFA9/CLPX/NUP133/NDU	19
GO:0046034	Processus métabolique de l'ATP	0.11	287/17913	2.23E-13	6.14E-11	5.09E-11	FS3	23
GO:0009205	Processus métabolique de purine ribonucléoside triphosphate	0.12	314/17913	2.18E-14	1.20E-11	9.96E-12	ENO1/AKA/NDUF810/AK2/ENO2/PFKL/HK1/NDUFV1/GNAI3/NDUFA9/CLPX/NUP133/NDUFS3	25
GO:0046394	Processus de biosynthèse de l'acide carboxylique	0.12	426/17913	1.95E-11	3.38E-09	2.80E-09	PHGDH/TP1/OSBP/ENO1/ENO2/PFKL/HK1/PYCR1/VCAN/PSAT1/OAT/NUP133/UGP2	25

B.

Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
Voies de neurodégénérescence – maladies multiples	13	6.13	0.06	5692, 84617, 4716, 51079, 2475, 7318, 4513, 5701, 4722, 4723, 5868, 4704, 5705 7167, 6675, 58472, 81889, 7360, 23646, 2821, 2026, 5214, 4722, 4723, 5230, 8623, 23530, 1152, 3098, 440, 2632, 2597, 204, 205, 2673, 5162, 4351, 29968, 51382, 6609, 26330, 1431, 9517, 217, 5831, 8228, 4942, 4704, 4282, 34, 38,	133	476	8644	2	1.00	0.54	0.51
Voies métaboliques	49	23.11	0.00	5211, 8566, 2023, 26227, 220, 4716, 10768, 226, 51079, 11253, 4513	133	1546	8644	2	0.00	0.00	0.00
Maladie d'Alzheimer	13	6.13	0.01	5692, 57142, 84617, 4716, 2597, 51079, 2475, 4513, 5701, 4722, 4723, 4704, 5705	133	384	8644	2	0.97	0.19	0.18
Maladie à coronavirus - COVID-19	8	3.77	0.06	6130, 6157, 9349, 6774, 6193, 6181, 11224, 1956	133	232	8644	2	1.00	0.54	0.51
Thermogénèse	8	3.77	0.06	4716, 1376, 51079, 2475, 4513, 4722, 4723, 4704	133	232	8644	2	1.00	0.54	0.51
Endocytose	9	4.25	0.04	5371, 1601, 387680, 161, 83737, 5868, 1956, 55040, 274 5692, 84617, 29979, 4716, 51079, 2475, 55746,	133	250	8644	2	1.00	0.37	0.35
Sclérose latérale amyotrophique	14	6.60	0.00	4513, 5701, 4722, 4723, 5868, 4704, 5705	133	364	8644	2	0.58	0.07	0.06
Maladie de Huntington	12	5.66	0.01	4716, 5692, 51079, 2475, 4513, 4722, 5701, 161, 4723, 84617, 4704, 5705	133	306	8644	3	0.81	0.12	0.11
Maladie de prions	11	5.19	0.01	4716, 3915, 5692, 51079, 4513, 4722, 5701, 4723, 84617, 4704, 5705	133	272	8644	3	0.87	0.14	0.13
Signalisation endocannabinoïde rétrograde	6	2.83	0.08	4716, 2773, 51079, 4722, 4723, 4704	133	148	8644	3	1.00	0.60	0.56
Ataxie spinocérébelleuse	6	2.83	0.07	5692, 10528, 2475, 5701, 4976, 5705	133	143	8644	3	1.00	0.55	0.52
Maladie de Parkinson	12	5.66	0.00	4716, 5692, 2773, 51079, 7318, 4513, 4722, 5701, 4723, 84617, 4704, 5705	133	266	8644	3	0.44	0.05	0.05
Stéatose hépatique non alcoolique	7	3.30	0.03	4716, 51079, 4513, 4722, 4723, 83737, 4704	133	155	8644	3	1.00	0.32	0.30
Biosynthèse des cofacteurs	7	3.30	0.03	4351, 204, 8566, 205, 217, 7360, 29968	133	153	8644	3	1.00	0.32	0.30
OXPPOS	7	3.30	0.02	51382, 4716, 51079, 4513, 4722, 4723, 4704	133	134	8644	3	0.98	0.20	0.19
Cardiomyopathie diabétique	12	5.66	0.00	5162, 4716, 1376, 2597, 2673, 51079, 2475, 6513, 4513, 4722, 4723, 4704	133	203	8644	4	0.06	0.01	0.01
Traitement des protéines dans le réticulum endoplasmique	11	5.19	0.00	3337, 5034, 10273, 3301, 10484, 5589, 11253, 5611, 5887, 51009, 29979	133	170	8644	4	0.06	0.01	0.01
Métabolisme de l'arginine et de la proline	4	1.89	0.04	217, 5831, 1152, 4942	133	50	8644	5	1.00	0.38	0.36
β-oxydation	4	1.89	0.03	34, 38, 1376, 217	133	43	8644	6	1.00	0.31	0.29
Métabolisme central du carbone dans le cancer	7	3.30	0.00	5162, 5211, 2475, 6513, 5214, 3098, 1956	133	70	8644	6	0.15	0.01	0.01
Métabolisme de l'amidon et du saccharose	4	1.89	0.02	2821, 2632, 3098, 7360	133	36	8644	7	0.98	0.20	0.19
Voie de signalisation HIF-1	13	6.13	0.00	5162, 5230, 5211, 6774, 2023, 3098, 2026, 226, 2597, 2475, 6513, 5214, 1956	133	109	8644	8	0.00	0.00	0.00
Métabolisme du galactose	4	1.89	0.01	5211, 5214, 3098, 7360	133	32	8644	8	0.95	0.17	0.16
Voie des PP	4	1.89	0.01	2821, 5211, 226, 5214	133	31	8644	8	0.93	0.17	0.16
Métabolisme du carbone	15	7.08	0.00	5162, 5230, 7167, 38, 5211, 2023, 26227, 3098, 29968, 2821, 2026, 226, 2597, 1431, 5214	133	115	8644	8	0.00	0.00	0.00
Métabolisme des sucres aminés et des sucres nucléotidiques	7	3.30	0.00	2821, 4351, 2673, 6675, 3098, 1727, 7360	133	49	8644	9	0.02	0.00	0.00
Biosynthèse des sucres nucléotidiques	6	2.83	0.00	2821, 4351, 2673, 6675, 3098, 7360	133	37	8644	11	0.05	0.01	0.01
Biosynthèse des acides aminés	13	6.13	0.00	5230, 7167, 5211, 2023, 26227, 29968, 440, 2026, 226, 2597, 1431, 5214, 5831	133	75	8644	11	0.00	0.00	0.00
Métabolisme du fructose et du mannose	6	2.83	0.00	7167, 4351, 5211, 226, 5214, 3098	133	34	8644	11	0.03	0.01	0.01
Glycolyse/néoglucogénèse	13	6.13	0.00	5162, 5230, 7167, 5211, 2023, 3098, 2821, 2026, 26330, 226, 2597, 217, 5214	133	67	8644	13	0.00	0.00	0.00
Métabolisme de la vitamine B6	2	0.94	0.05	8566, 29968	133	6	8644	22	1.00	0.67	0.63

Figure 64/Annexe 5. Tableau des résultats d'enrichissement pour le transcriptome des CStrom incubés en AA et à 3% d'O₂.

A. Dans un premier temps une analyse statistique a été menée pour identifier les protéines différenciellement exprimées pour la condition d'AA par rapport à la condition contrôlée de 3% d'O₂ (Log2FC compris en -0,6 et 0,6 et Pvalue < 0.06). Par la suite la liste des protéines, différenciellement exprimées, est classée par rapport à leur implication dans les différents processus biologiques « gene ontology » (GO). Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel ProteoRE. B. Tableau de la liste

des protéines, différenciellement exprimées, est classée par rapport à leur implication dans les différentes voies métaboliques KEGG. Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel DAVID.

AA vs ANO

A.

Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	geneID	Count
Processus métabolique de la lysine	0.02	12/17913	1.40E-04	6.01E-03	5.37E-03	OGDH/DLST/GCDH	3
Processus de biosynthèse de la glutamine	0.02	13/17913	1.80E-04	7.27E-03	6.49E-03	ALDH18A1/PYCR1/GLUD1	3
Processus de biosynthèse des acides α-aminés	0.03	51/17913	8.48E-05	4.01E-03	3.58E-03	ALDH18A1/SHMT2/PYCR1/MTAP/GLUD1	5
Allongement translationnel mitochondrial	0.04	86/17913	1.09E-05	7.46E-04	6.66E-04	MRPS34/MRPL39/MRPL49/MRPL45/MRPL13/MRPS35/PTCD3	7
Processus métabolique de l'acide tricarboxylique	0.05	33/17913	3.53E-10	4.03E-08	3.60E-08	PDHB/IDH3A/MDH2/OGDH/DLST/IDH1/GLUD1/FAHD1	8
Processus catabolique des acides gras	0.05	94/17913	1.80E-06	1.43E-04	1.28E-04	CPT2/ACADM/MMUT/ETFA/ECHS1/CRAT/GCDH/DECR2	8
Traduction mitochondriale	0.06	125/17913	1.64E-06	1.36E-04	1.22E-04	MRPL45/MRPL13/MRPS35/PTCD3	9
Processus métabolique du composé contenant de la pyridine	0.06	184/17913	3.78E-05	1.97E-03	1.76E-03	PDHB/RAE1/MDH2/OGDH/NUP160/PTGIS/STAT3/IDH1/LDHA	9
Processus métabolique des acides α-aminés	0.06	200/17913	1.15E-05	7.66E-04	6.84E-04	OGDH/DLST/GCLM/GCDH/GLUD1	10
Expression des gènes mitochondriaux	0.07	148/17913	8.02E-08	7.32E-06	6.54E-06	LRPPRC/MRPS34/SHMT2/MRPL39/MRPL49/MRPL45/MRPL13/HSD17B10/MRPS35/PNPT1/PTCD3	11
Transport d'électrons mitochondriaux, NADH vers ubiquinone	0.08	55/17913	4.60E-14	6.63E-12	5.92E-12	NDUFB9/NDUFAS/NDUFS1/NDUF9/NDUF3/NDUFA10/NDUF52	12
Assemblage du complexe NADH déshydrogénase	0.08	64/17913	3.22E-13	4.20E-11	3.75E-11	NDUFB9/NDUFAS/NDUFS1/NDUF9/NDUF3/NDUFA10/NDUF52	12
Processus de biosynthèse des cofacteurs	0.08	310/17913	2.02E-05	1.23E-03	1.10E-03	COX2/PDHB/RAE1/CNDP2/OGDH/NUP160/PTGIS/STAT3/GCLM/GCDH/LDHA/MTHFD1L	12
Respiration aérobie	0.08	68/17913	2.45E-14	3.73E-12	3.33E-12	COXA/COX2/PDHB/SHMT2/UQCRC2/IDH3A/MDH2/OGDH/DLST/IDH1/UQCRC1/FAHD1/COX5B	13
Processus métabolique des composés sulfurés	0.08	346/17913	1.24E-05	8.08E-04	7.22E-04	SQOR/MMUT/PDHB/TST/GLO1/MTAP/CNDP2/OGDH/DLST/HSPA9/IDH1/GCLM/GCDH	13
Processus métabolique du coenzyme	0.09	366/17913	4.63E-06	3.43E-04	3.06E-04	PTGIS/STAT3/IDH1/GCDH/LDHA/MTHFD1L/SLC2A1	14
Processus de biosynthèse de l'acide carboxylique	0.09	426/17913	2.55E-05	1.49E-03	1.33E-03	ALDH18A1/SHMT2/PYCR1/RAE1/MTAP/OGDH/NUP160/PTGIS/STAT3/LTA4H/LDHA/MTHFD1L/GLUD1/DECR2	14
Réponse au stress oxydatif	0.09	442/17913	3.82E-05	1.97E-03	1.76E-03	COL1A1/PRDX3/CTNNA1/IDH1/GCLM/PNPT1/NDUF52	14
Processus métabolique des acides aminés cellulaires	0.10	347/17913	7.58E-08	7.17E-06	6.40E-06	ALDH18A1/PPA2/RARS2/MMUT/SHMT2/TST/PSMD9/PYCR1/MTAP/OGDH/DLST/HSD17B10/PSME3/GCLM/GCDH/GLUD1	16
Chaîne de transport d'électrons respiratoire	0.11	106/17913	1.93E-18	7.41E-16	6.61E-16	COXA/COX2/NDUF54/ETFA/UQCRC2/NDUFB10/NDUFV1/NDUF3/NDUF84/NDUFB9/NDUFAS/UQCRC1/NDUF51/NDUF9/NDUF3/NDUFA10/NDUF52/COX5B	18
Chaîne de transport d'électrons	0.12	175/17913	1.17E-15	1.89E-13	1.68E-13	COXA/COX2/NDUF54/ETFA/UQCRC2/NDUFB10/NDUFV1/NDUF3/NDUF84/NDUFB9/NDUFAS/UQCRC1/NDUF51/NDUF9/NDUF3/NDUFA10/NDUF52/ALDH2/COX5B	19
Organisation des mitochondries	0.14	466/17913	1.43E-10	1.71E-08	1.52E-08	NDUFAS/NDUFB10/NDUFV1/NDUF3/NDUF84/NDUFB9/NDUF54/LONP1/PITRM1/HSD17B10/PRDX3/STAT3/SSBP1/NDUF51/NDUF9/NDUF3/GCLM/NDUFA10/TIMM50/ATP5PD/PNPT1/NDUF52	22
Respiration cellulaire	0.17	176/17913	5.39E-26	1.48E-22	1.32E-22	COXA/COX2/NDUF54/PDHB/SHMT2/ETFA/UQCRC2/NDUFB10/IDH3A/NDUFV1/NDUF53/NDUF84/MDH2/NDUFB9/NDUFAS/OGDH/DLST/IDH1/UQCRC1/NDUF51/NDUF9/NDUFB3/NDUFA10/PNPT1/NDUF52/FAHD1/COX5B	27
Processus métabolique des ribonucléotides puriques	0.19	500/17913	6.65E-17	1.14E-14	1.02E-14	COXA/COX2/NDUF54/PDHB/SHMT2/CLPX/UQCRC2/NDUFB10/NDUFV1/NDUF53/RAE1/NDUF84/NDUFB9/RAB23/NDUFAS/OGDH/DLST/NUP160/STAT3/UQCRC1/NDUF51/NDUF9/NDUF3/NDUFA10/GNAI3/ATP5PD/GCDH/LDHA/NDUF52/COX5B	30

B.

Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR	
				6472, 25902, 5740, 9588, 58472, 81889, 2746, 1892, 4048, 4720, 5019, 4722, 4723, 4724, 4967, 7372, 1743, 4698, 2639, 5162, 7385, 7384, 7263, 4594, 4191, 4507, 3417, 4705, 3939, 4709, 55748, 217, 5831, 5832, 5238, 10476, 10314, 3419, 4704, 9377, 34								
Voies métaboliques	51	31.48	1.32E-10	4716, 10768, 4719, 3028, 2730, 4710, 4513, 2739, 1329, 4715	116	1546	8644	2	3E-08	7E-09	7E-09	
Voie de signalisation HIF-1	5	3.09	0.0571314	5162, 3939, 6774, 6513, 7018	116	109	8644	3	1E-04	4E-01	4E-01	
Voies de neurodégénérescence – maladies multiples	22	13.58	9.73E-07	9377, 7385, 7384, 4705, 4716, 4719, 4709, 3028, 1499, 4720, 4698, 4710, 4513, 4722, 4723, 10476, 4724, 3309, 1329, 57	116	476	8644	3	2E-04	2E-05	1E-05	
Dégradation de l'ARN	4	2.47	0.0878348	3329, 3313, 80349, 87178	116	79	8644	4	1E+00	5E-01	5E-01	
Maladie d'Alzheimer	21	12.96	1.31E-07	9377, 7385, 7384, 4705, 4716, 4719, 4709, 3028, 1499, 4720, 4698, 4710, 4513, 4722, 4723, 10476, 4724, 1329, 5715, 47	116	384	8644	4	3E-05	2E-06	2E-06	
Sclérose latérale amyotrophique	22	13.58	1.02E-08	9377, 7385, 7384, 23279, 8480, 4705, 4716, 4719, 4709, 4720, 4698, 4710, 4513, 4722, 4723, 10476, 4724, 3309, 1329, 57	116	364	8644	5	2E-06	2E-07	2E-07	
Maladie de Huntington	19	11.73	9.78E-08	9377, 7385, 7384, 4705, 4716, 4719, 4709, 4720, 4698, 4710, 4513, 4722, 4723, 10476, 4724, 1329, 5715, 4704, 4715	116	306	8644	5	2E-05	2E-06	2E-06	
Dégradation de la lysine	4	2.47	0.0512322	1743, 1892, 217, 2639	116	63	8644	5	1E+00	4E-01	4E-01	
Biosynthèse des acides aminés	5	3.09	0.0175228	6472, 3417, 5831, 5832, 3419	116	75	8644	5	1E+00	2E-01	1E-01	
Contraction du muscle cardiaque	6	3.70	0.005935	9377, 7385, 781, 7384, 4513, 1329	116	87	8644	5	7E-01	6E-02	5E-02	
Métabolisme du glutathion	4	2.47	0.0399466	3417, 2730, 9588, 10314	116	57	8644	5	1E+00	3E-01	3E-01	
Métabolisme central du carbone dans le cancer	5	3.09	0.0139008	3417, 5162, 3939, 6513, 5159	116	70	8644	5	9E-01	1E-01	1E-01	
Maladie de prière	20	12.35	2.47E-09	9377, 7385, 7384, 4705, 4716, 4719, 4709, 4720, 4698, 4710, 4513, 4722, 4723, 10476, 4724, 3309, 1329, 5715, 4704, 47	116	272	8644	5	5E-07	7E-08	7E-08	
Maladie de Parkinson	21	12.96	2.41E-10	9377, 7385, 7384, 4705, 4716, 4719, 4709, 2773, 4720, 4698, 4710, 4513, 4722, 4723, 10476, 4724, 3309, 1329, 5715, 47	116	266	8644	6	5E-08	9E-09	8E-09	
Métabolisme de l'arginine et de la proline	4	2.47	0.0285928	55748, 217, 5831, 5832	116	50	8644	6	1E+00	2E-01	2E-01	
hsa05208:Chemical carcinogenesis - reactive oxygen spec	18	11.11	5.02E-09	9377, 7385, 7384, 4705, 4716, 4719, 4709, 4720, 4698, 4710, 4513, 4722, 4723, 10476, 4724, 1329, 4704, 4715	116	223	8644	6	1E-06	1E-07	1E-07	
Thermogénèse	20	12.35	1.66E-10	9377, 7385, 7384, 4705, 4716, 4719, 4709, 1376, 4720, 4698, 4710, 4513, 4722, 4723, 10476, 4724, 1329, 86, 4704, 4715	116	232	8644	6	4E-08	7E-09	7E-09	
Métabolisme du carbone	10	6.17	2.06E-05	6472, 3417, 5162, 2746, 1743, 4594, 1892, 4191, 4967, 3419	116	115	8644	6	4E-03	3E-04	3E-04	
Métabolisme du propanoate	3	1.85	0.0671973	4594, 3939, 1892	116	32	8644	7	1E+00	4E-01	4E-01	
Signalisation endocannabinoïde rétrograde	14	8.64	6.99E-08	2782, 4705, 4716, 4719, 4709, 2773, 4720, 4698, 4710, 4513, 4722, 4723, 4724, 4704, 4715	116	148	8644	7	1E-05	1E-06	1E-06	
Métabolisme du tryptophane	4	2.47	0.0180724	1743, 1892, 217, 2639	116	42	8644	7	1E+00	2E-01	1E-01	
Métabolisme de la β-alanine	3	1.85	0.0635345	1892, 55748, 217	116	31	8644	7	1E+00	4E-01	4E-01	
Métabolisme des glyoxylates et dicarboxylates	3	1.85	0.0599427	6472, 4594, 4191	116	30	8644	7	1E+00	4E-01	4E-01	
Métabolisme du pyruvate	5	3.09	0.0034132	5162, 3939, 217, 2739, 4191	116	47	8644	8	5E-01	4E-02	3E-02	
Stéatose hépatique non alcoolique	17	10.49	1.71E-10	9377, 7385, 7384, 4705, 4716, 4719, 4709, 4720, 4698, 4710, 4513, 4722, 4723, 4724, 1329, 4704, 4715	116	155	8644	8	4E-08	7E-09	7E-09	
hsa05415:Diabetic cardiomyopathy	23	14.20	1.54E-14	9377, 5162, 7385, 7384, 4705, 4716, 4719, 4709, 1278, 1376, 1277, 6513, 4720, 4698, 4710	116	209	8644	8	3E-12	3E-12	3E-12	
Métabolisme de la cystéine et de la méthionine	6	3.70	6.03E-04	4507, 7263, 10768, 3939, 2730, 4191	116	52	8644	8	1E-01	8E-03	7E-03	
β-oxydation	5	3.09	0.0024597	34, 1376, 1892, 217, 2639	116	43	8644	9	4E-01	3E-02	3E-02	
Dégradation de la valine, de la leucine et de l'isoleucine	6	3.70	4.14E-04	34, 4594, 3028, 1892, 217, 5019	116	48	8644	9	8E-02	5E-03	5E-03	
OXPFDOS	19	11.73	1.12E-13	9377, 7385, 7384, 4705, 4716, 4719, 4709, 27068, 4720, 4698, 4710, 4513, 4722, 4723, 10476, 4724, 1329, 4704, 4715	116	134	8644	11	2E-11	1E-11	1E-11	
Métabolisme de l'acide oxocarboxylique	5	3.09	9.03E-04	3417, 5162, 1743, 4967, 3419	116	33	8644	11	2E-01	1E-02	1E-02	
Métabolisme de l'acide lipoiqe	3	1.85	0.0258887	5162, 1743, 4967	116	19	8644	12	1E+00	2E-01	2E-01	
Cycle de Krebs	6	3.70	4.17E-05	3417, 5162, 1743, 4191, 4967, 3419	116	30	8644	15	9E-03	6E-04	5E-04	

Figure 65/Annexe 6. Tableau des résultats d'enrichissement pour le transcriptome des CStrom incubés en AA et ANO. A. Dans un premier temps une analyse statistique a été menée pour identifier les protéines différenciellement exprimées pour la condition d'AA par rapport à la condition d'ANO (Log2FC compris en -0,6 et 0,6 et Pvalue < 0.06). Par la suite la liste des protéines, différenciellement exprimées, est classée par rapport à leur implication dans les différents processus biologiques « gene ontology » (GO). Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel ProteoRE. B. Tableau de la liste des protéines, différenciellement exprimées, est classée par rapport à leur implication dans les différentes voies métaboliques KEGG. Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel DAVID.

Analyse métabolomique des CStroM issues des cultures en AA, ANO et à 3% d'O₂

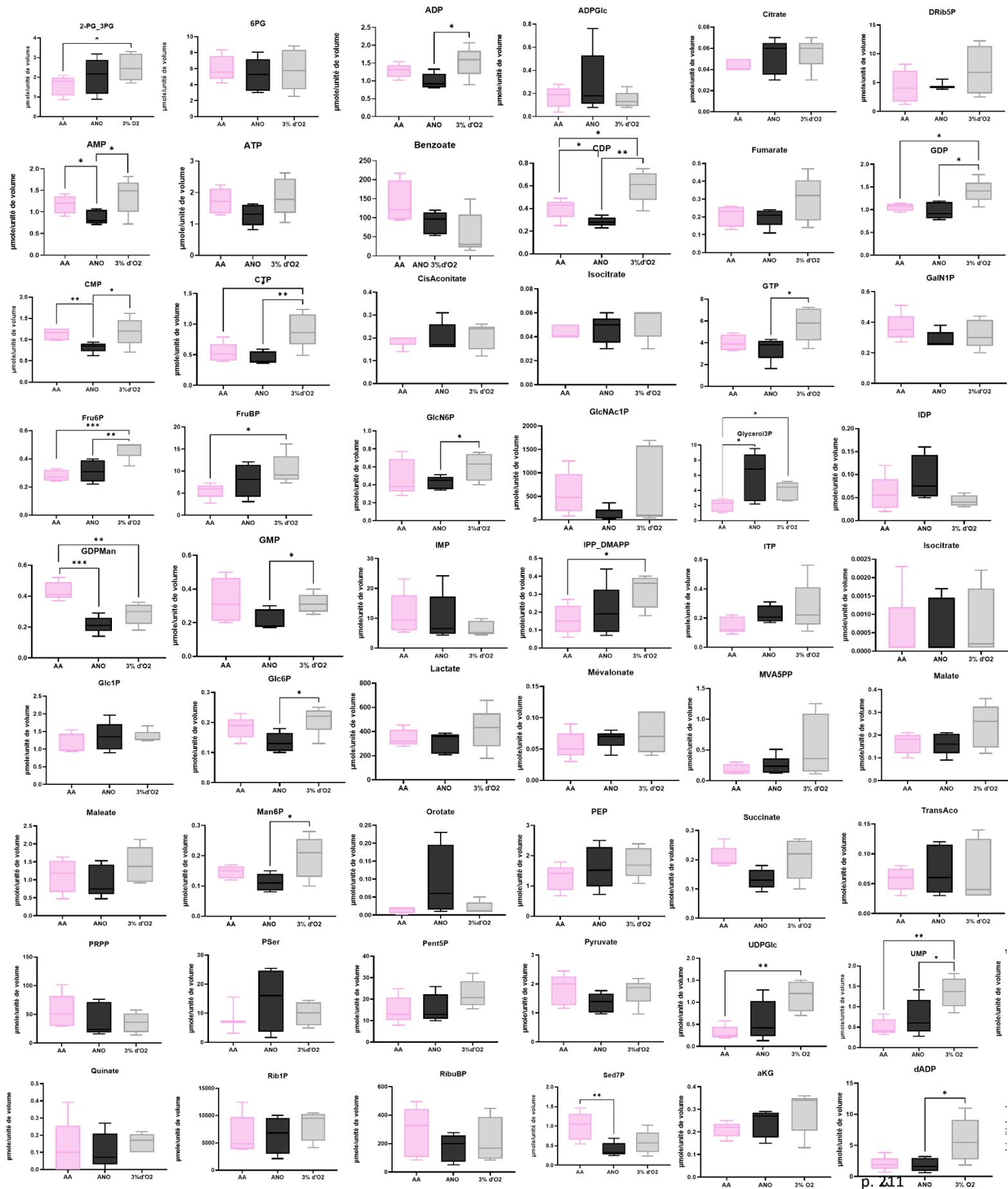




Figure 66/Annexe 7. Résultats de l'analyse du métabolome des CStrom incubés en AA, ANO et à 3% d'O₂. Les graphiques représentent la quantité en µM pour 84 métabolites identifiés. La quantité a été normalisée par le nombre de cellules et le volume cellulaire calculé pour les cellules dans chaque condition. N=5.

BIBLIOGRAPHIE

- Aad, G., Abajyan, T., Abbott, B., Abdallah, J., Abdel Khalek, S., Abidinov, O., Aben, R., Abi, B., Abolins, M., AbouZeid, O. S., Abramowicz, H., Abreu, H., Abulaiti, Y., Acharya, B. S., Adamczyk, L., Adams, D. L., Addy, T. N., Adelman, J., Adomeit, S., ... The ATLAS collaboration. (2013). Search for direct third-generation squark pair production in final states with missing transverse momentum and two b-jets in $\sqrt{s}=8$ TeV pp collisions with the ATLAS detector. *Journal of High Energy Physics*, 2013(10), 189. [https://doi.org/10.1007/JHEP10\(2013\)189](https://doi.org/10.1007/JHEP10(2013)189)
- Ahmed Laskar, A., & Younus, H. (2019). Aldehyde toxicity and metabolism: The role of aldehyde dehydrogenases in detoxification, drug resistance and carcinogenesis. *Drug Metabolism Reviews*, 51(1), 42–64. <https://doi.org/10.1080/03602532.2018.1555587>
- Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F. E., Neupert, W., & Nussberger, S. (1999). The TOM core complex: The general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 147(5), 959–968. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.5.959>
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., & Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404(6774), Article 6774. <https://doi.org/10.1038/35004599>
- Al Hasawi, N., Alkandari, M. F., & Luqmani, Y. A. (2014). Phosphofructokinase: A mediator of glycolytic flux in cancer progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 92(3), 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.05.007>
- Allard, M. F., Schönekeess, B. O., Henning, S. L., English, D. R., & Lopaschuk, G. D. (1994). Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *The American Journal of Physiology*, 267(2 Pt 2), H742-750. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.267.2.H742>
- Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2016). From Krebs to clinic: Glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.71>
- Anastasiou, D., Pouligiannis, G., Asara, J. M., Boxer, M. B., Jiang, J., Shen, M., Bellinger, G., Sasaki, A. T., Locasale, J. W., Auld, D. S., Thomas, C. J., Vander Heiden, M. G., & Cantley, L. C. (2011). Inhibition of Pyruvate Kinase M2 by Reactive Oxygen Species Contributes to Cellular Antioxidant Responses. *Science*, 334(6060), 1278–1283. <https://doi.org/10.1126/science.1211485>
- Andrzejewska, A., Lukomska, B., & Janowski, M. (2019). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *STEM CELLS*, 37(7), 855–864. <https://doi.org/10.1002/stem.3016>
- Anokhina, E. B., Buravkova, L. B., & Galchuk, S. V. (2009). Resistance of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stromal Precursor Cells to Anoxia In Vitro. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 148(1), 148–151. <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0643-7>
- Ao, Z., Quezada-Calvillo, R., Sim, L., Nichols, B. L., Rose, D. R., Sterchi, E. E., & Hamaker, B. R. (2007). Evidence of native starch degradation with human small intestinal maltase-glucoamylase (recombinant). *FEBS Letters*, 581(13), 2381–2388. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.035>
- Appelhoff, R. J., Tian, Y.-M., Raval, R. R., Turley, H., Harris, A. L., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., & Gleadle, J. M. (2004). Differential Function of the Prolyl Hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the Regulation of Hypoxia-inducible Factor *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38458–38465. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406026200>
- Arai, F., Hirao, A., & Suda, T. (2005). Regulation of Hematopoietic Stem Cells by the Niche. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 15(2), 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2005.03.002>
- Arnett, D. K., Blumenthal, R. S., Albert, M. A., Buroker, A. B., Goldberger, Z. D., Hahn, E. J., Himmelfarb, C. D., Khera, A., Lloyd-Jones, D., McEvoy, J. W., Michos, E. D., Miedema, M. D., Muñoz, D., Smith, S. C., Virani, S. S., Williams, K. A., Yeboah, J., & Ziaeian, B. (2019). 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American

- College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 140(11), e596–e646. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000678>
- Arnold, S., & Kadenbach, B. (1997). Cell Respiration is Controlled by ATP, an Allosteric Inhibitor of Cytochrome-c Oxidase. *European Journal of Biochemistry*, 249(1), 350–354. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00350.x>
- Auchincloss, H., & Bonventre, J. V. (2002). Transplanting cloned cells into therapeutic promise. *Nature Biotechnology*, 20(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nbt0702-665>
- Avecilla, S. T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D. K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T. E., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Witte, L., Hicklin, D. J., Bohlen, P., Eaton, D., Lyden, D., de Sauvage, F., & Rafii, S. (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature Medicine*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nm973>
- Bakker, B. M., Overkamp, K. M., van Maris, A. J. A., Kötter, P., Luttik, M. A. H., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 15–37. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00570.x>
- Banerjee, R., & Kumar, R. (2022). Gas regulation of complex II reversal via electron shunting to fumarate in the mammalian ETC. *Trends in Biochemical Sciences*, 47(8), 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.03.011>
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A., & Hoffman, R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*, 30(1), 42–48. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00769-X](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00769-X)
- Bartholomew, T. C., Powell, G. M., Dodgson, K. S., & Curtis, C. G. (1980). Oxidation of sodium sulphide by rat liver, lungs and kidney. *Biochemical Pharmacology*, 29(18), 2431–2437. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(80\)90346-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(80)90346-9)
- Bartlett, K., & Eaton, S. (2004). Mitochondrial β -oxidation. *European Journal of Biochemistry*, 271(3), 462–469. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03947.x>
- Barton, L. L., Fardeau, M.-L., & Fauque, G. D. (2014). Hydrogen sulfide: A toxic gas produced by dissimilatory sulfate and sulfur reduction and consumed by microbial oxidation. *Metal Ions in Life Sciences*, 14, 237–277. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9269-1_10
- Becker, A. J., McCulloch, E. A., & Till, J. E. (1963). *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.*
- Bekker, A., Holland, H. D., Wang, P.-L., Rumble, D., Stein, H. J., Hannah, J. L., Coetzee, L. L., & Beukes, N. J. (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature*, 427(6970), Article 6970. <https://doi.org/10.1038/nature02260>
- Ben-Shoshan, J., Schwartz, S., Luboshits, G., Maysel-Auslender, S., Barzelay, A., Polak-Charcon, S., Tzahor, E., Barshack, I., Barak, A., Levkovitch-Verbin, H., Keren, G., & George, J. (2008). Constitutive Expression of HIF-1 α and HIF-2 α in Bone Marrow Stromal Cells Differentially Promotes Their Proangiogenic Properties. *Stem Cells*, 26(10), 2634–2643. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0369>
- Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: An intricate game of cell death. *Cellular and Molecular Immunology*, 18(5), 1106–1121. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
- Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O. I., & Dick, J. E. (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nature Medicine*, 4(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/2023>
- Biagini, G. A., & Bernard, C. (2000). Primitive anaerobic protozoa: A false concept? *Microbiology (Reading)*, 146(5), 1019–1020.
- Bible, E., Qutachi, O., Chau, D. Y. S., Alexander, M. R., Shakesheff, K. M., & Modo, M. (2012). Neo-vascularization of the stroke cavity by implantation of human neural stem cells on VEGF-

- releasing PLGA microparticles. *Biomaterials*, 33(30), 7435–7446. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.085>
- Blackstone, E., Morrison, M., & Roth, M. B. (2005). H2S induces a suspended animation-like state in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5721), 518. <https://doi.org/10.1126/science.1108581>
- Blanco, L. P., & Kaplan, M. J. (2023). Metabolic alterations of the immune system in the pathogenesis of autoimmune diseases. *PLOS Biology*, 21(4), e3002084. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002084>
- Blank, C. E., & Sánchez-Baracaldo, P. (2010). Timing of morphological and ecological innovations in the cyanobacteria – a key to understanding the rise in atmospheric oxygen. *Geobiology*, 8(1), 1–23. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2009.00220.x>
- Borutaite, V., Budriunaite, A., Morkuniene, R., & Brown, G. C. (2001). Release of mitochondrial cytochrome c and activation of cytosolic caspases induced by myocardial ischaemia. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1537(2), 101–109. [https://doi.org/10.1016/s0925-4439\(01\)00062-x](https://doi.org/10.1016/s0925-4439(01)00062-x)
- Bosma, M. J., & Carroll, A. M. (1991). The SCID mouse mutant: Definition, characterization, and potential uses. *Annual Review of Immunology*, 9, 323–350. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.09.040191.001543>
- Bourke, V. A., Watchman, C. J., Reith, J. D., Jorgensen, M. L., Dieudonné, A., & Bolch, W. E. (2009). Spatial gradients of blood vessels and hematopoietic stem and progenitor cells within the marrow cavities of the human skeleton. *Blood*, 114(19), 4077–4080. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-192922>
- Boveri: Ueber die Entstehung des Gegensatzes zwischen... - Google Scholar. (n.d.). Retrieved September 13, 2023, from https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Sitzungsberichte+der+Gesellschaft+%C3%BCr+Morphologie+und+Physiologie+in+M%C3%BCnchen&title=Ueber+die+Entstehung+des+Gegensatzes+zwischen+den+Geschlechtszellen+und+den+somatischen+Zellen+bei+Ascaris+megalocephala,+nebst+Bemerkungen+zur+Entwicklungsgeschichte+der+Nematoden&author=T+Boveri&volume=8&publication_year=1892&pages=114-25&
- Bowler, M. W., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2006). How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23), 8646–8649. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602915103>
- Boyette, L. B., Creasey, O. A., Guzik, L., Lozito, T., & Tuan, R. S. (2014). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells display enhanced clonogenicity but impaired differentiation with hypoxic preconditioning. *Stem Cells Translational Medicine*, 3(2), 241–254. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0079>
- Brahimi-Horn, M. C., & Pouyssegur, J. (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Letters*, 581(19), 3582–3591. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.018>
- Bricker, D. K., Taylor, E. B., Schell, J. C., Orsak, T., Boutron, A., Chen, Y.-C., Cox, J. E., Cardon, C. M., Van Vranken, J. G., Dephoure, N., Redin, C., Boudina, S., Gygi, S. P., Brivet, M., Thummel, C. S., & Rutter, J. (2012). A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6090), 96–100. <https://doi.org/10.1126/science.1218099>
- Bron, D., De Bruyn, C., Lagneaux, L., Tondreau, T., & Delforge, A. (2002). [Hematopoietic stem cells: Source, indications and perspectives]. *Bulletin Et Memoires De l'Academie Royale De Medecine De Belgique*, 157(1–2), 135–145; discussion 145-146.
- Brosius, F. C., Nguyen, N., Egert, S., Lin, Z., Deeb, G. M., Haas, F., Schwaiger, M., & Sun, D. (1997). Increased Sarcolemmal Glucose Transporter Abundance in Myocardial Ischemia. *The American Journal of Cardiology*, 80(3, Supplement 1), 77A-84A. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(97\)00460-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(97)00460-8)
- Bruno, S., Grange, C., Deregibus, M. C., Calogero, R. A., Saviozzi, S., Collino, F., Morando, L., Busca, A., Falda, M., Bussolati, B., Tetta, C., & Camussi, G. (2009). Mesenchymal stem cell-derived

- microvesicles protect against acute tubular injury. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20(5), 1053–1067. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008070798>
- Brustovetskiĭ, N. N., Dedukhova, V. N., Egorova, M. V., Mokhova, E. N., & Skulachev, V. P. (1991). [Uncoupling of oxidative phosphorylation by fatty acids and detergents suppressed by ATP/ADP antiporter inhibitors]. *Biokhimiia (Moscow, Russia)*, 56(6), 1042–1048.
- Buerk, D. G., Shonat, R. D., Riva, C. E., & Cranstoun, S. D. (1993). O₂ gradients and countercurrent exchange in the cat vitreous humor near retinal arterioles and venules. *Microvascular Research*, 45(2), 134–148. <https://doi.org/10.1006/mvre.1993.1013>
- Bulkley, G. B. (1987). Free radical-mediated reperfusion injury: A selective review. *The British Journal of Cancer. Supplement*, 8, 66–73.
- Burant, C. F., Takeda, J., Brot-Laroche, E., Bell, G. I., & Davidson, N. O. (1992). Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(21), 14523–14526.
- Butterworth, J., Yates, C. M., & Reynolds, G. P. (1985). Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and γ -glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *Journal of the Neurological Sciences*, 67(2), 161–171. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(85\)90112-1](https://doi.org/10.1016/0022-510X(85)90112-1)
- C. Bompotis, G., Deftereos, S., Angelidis, C., Choidis, E., Panagopoulou, V., Kaoukis, A., P. Vassilikos, V., W. Cleman, M., & Giannopoulos, G. (2016). Altered Calcium Handling in Reperfusion Injury. *Medicinal Chemistry*, 12(2), 114–130.
- Cahill, G. F. (2006). Fuel metabolism in starvation. *Annual Review of Nutrition*, 26, 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.26.061505.111258>
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5), 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *STEM CELLS Translational Medicine*, 6(6), 1445–1451. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
- Cardenas, J. M., & Dyson, R. D. (1978). Mammalian pyruvate kinase hybrid isozymes: Tissue distribution and physiological significance. *The Journal of Experimental Zoology*, 204(3), 361–367. <https://doi.org/10.1002/jez.1402040307>
- Carracedo, A., Cantley, L. C., & Pandolfi, P. P. (2013). Cancer metabolism: Fatty acid oxidation in the limelight. *Nature Reviews Cancer*, 13(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrc3483>
- Cavalier-Smith, T. (1987). The Origin of Eukaryote and Archaeobacterial Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 503(1), 17–54. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb40596.x>
- Cecchini, G. (2022). Complexities of complex II: Sulfide metabolism in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 298(3). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101661>
- Ceradini, D. J., Kulkarni, A. R., Callaghan, M. J., Tepper, O. M., Bastidas, N., Kleinman, M. E., Capla, J. M., Galiano, R. D., Levine, J. P., & Gurtner, G. C. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine*, 10(8), 858–864. <https://doi.org/10.1038/nm1075>
- Chandel, N. S. (2021). Glycolysis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(5), a040535. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040535>
- Chandel, N. S., Budinger, G. R., & Schumacker, P. T. (1996). Molecular oxygen modulates cytochrome c oxidase function. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(31), 18672–18677. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.31.18672>
- Chen, G., Gulbranson, D. R., Hou, Z., Bolin, J. M., Ruotti, V., Probasco, M. D., Smuga-Otto, K., Howden, S. E., Diol, N. R., Propson, N. E., Wagner, R., Lee, G. O., Antosiewicz-Bourget, J., Teng, J. M. C., & Thomson, J. A. (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nature Methods*, 8(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1593>
- Chen, H., Chomyn, A., & Chan, D. C. (2005). Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction *. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26185–26192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503062200>

- Chen, Q., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2008). Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 294(2), C460–C466. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00211.2007>
- Chen, Z., Zhang, X., Li, H., Liu, H., Xia, Y., & Xun, L. (2018). The Complete Pathway for Thiosulfate Utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(22), e01241-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01241-18>
- Chinopoulos, C., Gerencser, A. A., Mandi, M., Mathe, K., Töröcsik, B., Doczi, J., Turiak, L., Kiss, G., Konräd, C., Vajda, S., Vereczki, V., Oh, R. J., & Adam-Vizi, V. (2010). Forward operation of adenine nucleotide translocase during F₀F₁-ATPase reversal: Critical role of matrix substrate-level phosphorylation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(7), 2405–2416. <https://doi.org/10.1096/fj.09-149898>
- Choi, D. W. (1990). Cerebral hypoxia: Some new approaches and unanswered questions. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 10(8), 2493–2501. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-08-02493.1990>
- Chouchani, E. T., Pell, V. R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S. Y., Robb, E. L., Logan, A., Nadtochiy, S. M., Ord, E. N. J., Smith, A. C., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C.-H., Dare, A. J., James, A. M., Rogatti, S., Hartley, R. C., Eaton, S., Costa, A. S. H., ... Murphy, M. P. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, 515(7527), 431–435. <https://doi.org/10.1038/nature13909>
- Chouchani, E. T., Pell, V. R., James, A. M., Work, L. M., Saeb-Parsy, K., Frezza, C., Krieg, T., & Murphy, M. P. (2016). A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metabolism*, 23(2), 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.009>
- Chow, D. C., Wenning, L. A., Miller, W. M., & Papoutsakis, E. T. (2001a). Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophysical Journal*, 81(2), 675–684. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75732-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75732-3)
- Chow, D. C., Wenning, L. A., Miller, W. M., & Papoutsakis, E. T. (2001b). Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophysical Journal*, 81(2), 685–696. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75733-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75733-5)
- Cipolleschi, M. G., Dello Sbarba, P., & Olivotto, M. (1993). The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*, 82(7), 2031–2037.
- Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F., & Shaper, J. H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *The Journal of Immunology*, 133(1), 157–165. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.133.1.157>
- Cody, G. D. (2004). TRANSITION METAL SULFIDES AND THE ORIGINS OF METABOLISM. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 32(1), 569–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.32.101802.120225>
- Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J. Y., Butcher, E. C., & Laudanna, C. (2000). Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: Differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*, 13(6), 759–769. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)00074-1](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)00074-1)
- Corbet, C., & Feron, O. (2015). Metabolic and mind shifts: From glucose to glutamine and acetate addictions in cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 18(4), 346. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000178>
- Cori, C. F. (1983). Embden and the glycolytic pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 8(7), 257–259. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(83\)90353-5](https://doi.org/10.1016/0968-0004(83)90353-5)
- Cosentino, C., Grieco, D., & Costanzo, V. (2011). ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair. *The EMBO Journal*, 30(3), 546–555. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.330>

- Couzinet, A., Hérincs, Z., & Hueber, A.-O. (2002). Régulation de la mort cellulaire programmée: Vers une conception plus dynamique. *médecine/sciences*, 18(8–9), Article 8–9. <https://doi.org/10.1051/medsci/20021889841>
- Covas, D. T., Panepucci, R. A., Fontes, A. M., Silva Jr, W. A., Orellana, M. D., Freitas, M. C., Neder, L., Santos, A. R., Peres, L. C., & Jamur, M. C. (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental Hematology*, 36(5), 642–654.
- Crane, F., Mii, S., Hauge, J., GREEN, D., & Beinert, H. (1956). On the mechanism of dehydrogenation of fatty acyl derivatives of coenzyme A. I. The general fatty acyl coenzyme A dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 218, 701–706. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65836-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65836-3)
- Creed, S., & McKenzie, M. (2019). Measurement of Mitochondrial Membrane Potential with the Fluorescent Dye Tetramethylrhodamine Methyl Ester (TMRM). In M. Haznadar (Ed.), *Cancer Metabolism: Methods and Protocols* (pp. 69–76). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9027-6_5
- Crisan, M., Yap, S., Castella, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P.-N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B. M., Badyrak, S., Bühring, H.-J., Giacobino, J.-P., Lazzari, L., ... Péault, B. (2008). A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*, 3(3), 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>
- Dai, Y., Wang, S., Chang, S., Ren, D., Shali, S., Li, C., Yang, H., Huang, Z., & Ge, J. (2020). M2 macrophage-derived exosomes carry microRNA-148a to alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury via inhibiting TXNIP and the TLR4/NF-κB/NLRP3 inflammasome signaling pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 142, 65–79. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.02.007>
- Dalla Pozza, E., Dando, I., Pacchiana, R., Liboi, E., Scupoli, M. T., Donadelli, M., & Palmieri, M. (2020). Regulation of succinate dehydrogenase and role of succinate in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 98, 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.04.013>
- Danet, G. H., Pan, Y., Luongo, J. L., Bonnet, D. A., & Simon, M. C. (2003). Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(1), 126–135. <https://doi.org/10.1172/JCI17669>
- Dawson, T. L., Gores, G. J., Nieminen, A. L., Herman, B., & Lemasters, J. J. (1993). Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *The American Journal of Physiology*, 264(4 Pt 1), C961-967. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.264.4.C961>
- De Miguel, M. P., Alcaina, Y., Sainz de la Maza, D., & Lopez-Iglesias, P. (2015). Cell Metabolism Under Microenvironmental Low Oxygen Tension Levels in Stemness, Proliferation and Pluripotency. *Current Molecular Medicine*, 15(4), 343–359.
- DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., & Thompson, C. B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19345–19350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709747104>
- Dello Sbarba, P., Cipolleschi, M. G., & Olivetto, M. (1987). Hemopoietic progenitor cells are sensitive to the cytostatic effect of pyruvate. *Experimental Hematology*, 15(2), 137–142.
- Delorme, B., Ringe, J., Gallay, N., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Jorgensen, C., Rosset, P., Sensebé, L., Layrolle, P., Häupl, T., & Charbord, P. (2008). Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood*, 111(5), 2631–2635. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-099622>
- Dennis, S. C., Gevers, W., & Opie, L. H. (1991). Protons in ischemia: Where do they come from; where do they go to? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 23(9), 1077–1086. [https://doi.org/10.1016/0022-2828\(91\)91642-5](https://doi.org/10.1016/0022-2828(91)91642-5)
- Denu, R. A., & Hematti, P. (2016). Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2989076. <https://doi.org/10.1155/2016/2989076>

- Devogelaere, B., Sammels, E., & De Smedt, H. (2008). The IRBIT domain adds new functions to the AHCY family. *BioEssays*, *30*(7), 642–652. <https://doi.org/10.1002/bies.20772>
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S., & Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, *99*(10), 3838–3843. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3838>
- Diakos, N. A., Navankasattusas, S., Abel, E. D., Rutter, J., McCreath, L., Ferrin, P., McKellar, S. H., Miller, D. V., Park, S. Y., Richardson, R. S., Deberardinis, R., Cox, J. E., Kfoury, A. G., Selzman, C. H., Stehlik, J., Fang, J. C., Li, D. Y., & Drakos, S. G. (2016). Evidence of Glycolysis Up-Regulation and Pyruvate Mitochondrial Oxidation Mismatch During Mechanical Unloading of the Failing Human Heart: Implications for Cardiac Reloading and Conditioning. *JACC. Basic to Translational Science*, *1*(6), 432–444. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.06.009>
- Diaz-Ruiz, A., Lanasa, M., Garcia, J., Mora, H., Fan, F., Martin-Montalvo, A., Di Francesco, A., Calvo-Rubio, M., Salvador-Pascual, A., Aon, M. A., Fishbein, K. W., Pearson, K. J., Villalba, J. M., Navas, P., Bernier, M., & de Cabo, R. (2018). Overexpression of CYB5R3 and NQO1, two NAD⁺-producing enzymes, mimics aspects of caloric restriction. *Aging Cell*, *17*(4), e12767. <https://doi.org/10.1111/accel.12767>
- D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G. A., Roos, B. A., & Schiller, P. C. (2006). Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone*, *39*(3), 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.02.061>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Double, E. B., Mabuchi, K., Cullings, H. M., Preston, D. L., Kodama, K., Shimizu, Y., Fujiwara, S., & Shore, R. E. (2011). Long-term Radiation-Related Health Effects in a Unique Human Population: Lessons Learned from the Atomic Bomb Survivors of Hiroshima and Nagasaki. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, *5*(S1), S122–S133. <https://doi.org/10.1001/dmp.2011.21>
- Douville, J., Beaulieu, R., & Balicki, D. (2009). ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells and Development*, *18*(1), 17–25. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0055>
- Drouet, M., Mourcin, F., Grenier, N., Delaunay, C., Mayol, J. F., Lataillade, J. J., Peinnequin, A., & Hérodin, F. (2005). Mesenchymal stem cells rescue CD34⁺ cells from radiation-induced apoptosis and sustain hematopoietic reconstitution after coculture and cograftering in lethally irradiated baboons: Is autologous stem cell therapy in nuclear accident settings hype or reality? *Bone Marrow Transplantation*, *35*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704970>
- Du, J., Chen, Y., Li, Q., Han, X., Cheng, C., Wang, Z., Danielpour, D., Dunwoodie, S. L., Bunting, K. D., & Yang, Y.-C. (2012). HIF-1 α deletion partially rescues defects of hematopoietic stem cell quiescence caused by Cited2 deficiency. *Blood*, *119*(12), 2789–2798. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-387902>
- Dua, A., & Lee, C. J. (2016). Epidemiology of Peripheral Arterial Disease and Critical Limb Ischemia. *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*, *19*(2), 91–95. <https://doi.org/10.1053/j.tvir.2016.04.001>
- Ducker, G. S., & Rabinowitz, J. D. (2017). One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metabolism*, *25*(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.009>
- Dyall, S. D., Koehler, C. M., Delgadillo-Correa, M. G., Bradley, P. J., Plümper, E., Leuenberger, D., Turck, C. W., & Johnson, P. J. (2000). Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: Conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(7), 2488–2497. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.7.2488-2497.2000>

- Eltzschig, H. K., & Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion—From mechanism to translation. *Nature Medicine*, *17*(11), 10.1038/nm.2507. <https://doi.org/10.1038/nm.2507>
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., & Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(9), 4273–4278. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4273>
- Embden, G., Deuticke, H. J., & Kraft, G. (1933). Über die Intermediären Vorgänge bei der Glykolyse in der Muskulatur. *Klinische Wochenschrift*, *12*(6), 213–215. <https://doi.org/10.1007/BF01757728>
- Epstein, A. C. R., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y.-M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2001). C. elegans EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation. *Cell*, *107*(1), 43–54. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00507-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00507-4)
- Escobar-Henriques, M., & Anton, F. (2013). Mechanistic perspective of mitochondrial fusion: Tubulation vs. fragmentation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1833*(1), 162–175. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.07.016>
- Esser, C., Ahmadinejad, N., Wiegand, C., Rotte, C., Sebastiani, F., Gelius-Dietrich, G., Henze, K., Kretschmann, E., Richly, E., Leister, D., Bryant, D., Steel, M. A., Lockhart, P. J., Penny, D., & Martin, W. (2004). A genome phylogeny for mitochondria among alpha-proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(9), 1643–1660. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh160>
- Estrada, J. C., Albo, C., Benguría, A., Dopazo, A., López-Romero, P., Carrera-Quintanar, L., Roche, E., Clemente, E. P., Enríquez, J. A., Bernad, A., & Samper, E. (2012). Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death and Differentiation*, *19*(5), 743–755. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.172>
- Fan, J., Cai, H., Yang, S., Yan, L., & Tan, W. (2008). Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo culture of CD34(+) cells. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, *151*(2), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.06.008>
- Fang, H.-Y., Hughes, R., Murdoch, C., Coffelt, S. B., Biswas, S. K., Harris, A. L., Johnson, R. S., Imityaz, H. Z., Simon, M. C., Fredlund, E., Greten, F. R., Rius, J., & Lewis, C. E. (2009). Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia. *Blood*, *114*(4), 844–859. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195941>
- Fausser, A., & Messner, H. (1979). Identification of megakaryocytes, macrophages, and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts. *Blood*, *53*(5), 1023–1027. <https://doi.org/10.1182/blood.V53.5.1023.1023>
- Fehrer, C., Brunauer, R., Laschober, G., Unterluggauer, H., Reitingger, S., Kloss, F., Gully, C., Gaßner, R., & Lepperdinger, G. (2007). Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*, *6*(6), 745–757. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00336.x>
- Fenchel, T., & Finlay, B. J. (1995). *Ecology and Evolution in Anoxic Worlds*. Oxford University Press.
- Fendt, S.-M., Bell, E. L., Keibler, M. A., Olenchock, B. A., Mayers, J. R., Wasylenko, T. M., Vokes, N. I., Guarente, L., Heiden, M. G. V., & Stephanopoulos, G. (2013). Reductive glutamine metabolism is a function of the α -ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nature Communications*, *4*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms3236>
- Fernandes, J., Guedes, P. G., Lage, C. L. S., Rodrigues, J. C. F., & Lage, C. de A. S. (2012). Tumor malignancy is engaged to prokaryotic homolog toolbox. *Medical Hypotheses*, *78*(4), 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.12.014>
- Ferre, T., Riu, E., Bosch, F., & Valera, A. (1996). Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation*

- of *American Societies for Experimental Biology*, 10(10), 1213–1218. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.10.8751724>
- Filipovic, M. R., Zivanovic, J., Alvarez, B., & Banerjee, R. (2018). Chemical Biology of H2S Signaling through Persulfidation. *Chemical Reviews*, 118(3), 1253–1337. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00205>
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), Article 6809. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Flamme, I., Fröhlich, T., von Reutern, M., Kappel, A., Damert, A., & Risau, W. (1997). HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels. *Mechanisms of Development*, 63(1), 51–60. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(97\)00674-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(97)00674-6)
- Flanagan, S. P. (1966). “Nude”, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genetical Research*, 8(3), 295–309. <https://doi.org/10.1017/s0016672300010168>
- Folmes, C. D. L., Dzeja, P. P., Nelson, T. J., & Terzic, A. (2012). Mitochondria in control of cell fate. *Circulation Research*, 110(4), 526–529. <https://doi.org/10.1161/RES.0b013e31824ae5c1>
- Ford, C. E., Hamerton, J. L., Barnes, D. W., & Loutit, J. F. (1956). Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*, 177(4506), 452–454. <https://doi.org/10.1038/177452a0>
- Forge, J., Burtin, B., & Massabuau, J.-C. (1989). Maintenance of Oxygen Consumption in Resting Silurus Glanis at Different Levels of Ambient Oxygenation. *Journal of Experimental Biology*, 143(1), 305–319. <https://doi.org/10.1242/jeb.143.1.305>
- Forman, H. J., Maiorino, M., & Ursini, F. (2010). Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry*, 49(5), 835–842. <https://doi.org/10.1021/bi9020378>
- Forristal, C. E., Winkler, I. G., Nowlan, B., Barbier, V., Walkinshaw, G., & Levesque, J.-P. (2013). Pharmacologic stabilization of HIF-1 α increases hematopoietic stem cell quiescence in vivo and accelerates blood recovery after severe irradiation. *Blood*, 121(5), 759–769. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-408419>
- François, S., Bensidhoum, M., Mouseddine, M., Mazurier, C., Allenet, B., Semont, A., Frick, J., Saché, A., Bouchet, S., Thierry, D., Gourmelon, P., Gorin, N.-C., & Chapel, A. (2006). Local Irradiation Not Only Induces Homing of Human Mesenchymal Stem Cells at Exposed Sites but Promotes Their Widespread Engraftment to Multiple Organs: A Study of Their Quantitative Distribution After Irradiation Damage. *Stem Cells*, 24(4), 1020–1029. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0260>
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 3(4), 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
- Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luriá, E. A., & Ruadkow, I. A. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental Hematology*, 2(2), 83–92.
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), 230–247.
- Fry, M., & Green, D. E. (1981). Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *Journal of Biological Chemistry*, 256(4), 1874–1880. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69888-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69888-1)
- Gaidos, E. J., Nealson, K. H., & Kirschvink, J. L. (1999). Life in Ice-Covered Oceans. *Science*, 284(5420), 1631–1633. <https://doi.org/10.1126/science.284.5420.1631>
- Gaill, F. (1993). Aspects of life development at deep sea hydrothermal vents. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(6), 558–565. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.6.8472894>
- Galli, G. L. J., & Richards, J. G. (2014). Mitochondria from anoxia-tolerant animals reveal common strategies to survive without oxygen. *Journal of Comparative Physiology B*, 184(3), 285–302. <https://doi.org/10.1007/s00360-014-0806-3>

- Gao, L., Chen, X.-H., Zhang, X., Zhang, C., Gao, L., Peng, X.-G., Gong, Y., Liang, X., Hao, L., & Wang, Q.-Y. (2009). [Contribution of SDF-1/CXCR4 axis on proliferation of megakaryocyte co-cultured with human umbilical cord blood-derived stromal cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, *17*(2), 412–416.
- Gao, L., Wang, L., Wei, Y., Krishnamurthy, P., Walcott, G. P., Menasché, P., & Zhang, J. (2020). Exosomes secreted by hiPSC-derived cardiac cells improve recovery from myocardial infarction in swine. *Science Translational Medicine*, *12*(561), eaay1318. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay1318>
- Gatti, S., Bruno, S., Deregibus, M. C., Sordi, A., Cantaluppi, V., Tetta, C., & Camussi, G. (2011). Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia–reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *26*(5), 1474–1483. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr015>
- Geissler, A., Krimmer, T., Bömer, U., Guiard, B., Rassow, J., & Pfanner, N. (2000). Membrane Potential-Driven Protein Import into Mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(11), 3977–3991. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.11.3977>
- Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W.-F., & Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, *105*(7), 2821–2827. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3696>
- Gnecchi, M., He, H., Liang, O. D., Melo, L. G., Morello, F., Mu, H., Noiseux, N., Zhang, L., Pratt, R. E., Ingwall, J. S., & Dzau, V. J. (2005). Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nature Medicine*, *11*(4), 367–368. <https://doi.org/10.1038/nm0405-367>
- Goldberg, A. V., Molik, S., Tsaousis, A. D., Neumann, K., Kuhnke, G., Delbac, F., Vivares, C. P., Hirt, R. P., Lill, R., & Embley, T. M. (2008). Localization and functionality of microsporidian iron–sulphur cluster assembly proteins. *Nature*, *452*(7187), Article 7187. <https://doi.org/10.1038/nature06606>
- Goldblatt, C., Lenton, T. M., & Watson, A. J. (2006). Bistability of atmospheric oxygen and the Great Oxidation. *Nature*, *443*(7112), Article 7112. <https://doi.org/10.1038/nature05169>
- Goodwin, M. L., Harris, J. E., Hernández, A., & Gladden, L. B. (2007). Blood Lactate Measurements and Analysis during Exercise: A Guide for Clinicians. *Journal of Diabetes Science and Technology (Online)*, *1*(4), 558–569.
- Goubern, M., Andriamihaja, M., Nübel, T., Blachier, F., & Bouillaud, F. (2007). Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *21*(8), 1699–1706. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7407com>
- Gray, M. W., Lang, B. F., & Burger, G. (2004). Mitochondria of protists. *Annual Review of Genetics*, *38*, 477–524. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.142526>
- Grazia Cipolleschi, M., Marzi, I., Santini, R., Fredducci, D., Cristina Vinci, M., D’Amico, M., Rovida, E., Stivarou, T., Torre, E., Dello Sbarba, P., Stecca, B., & Olivotto, M. (2014). Hypoxia-resistant profile implies vulnerability of cancer stem cells to physiological agents, which suggests new therapeutic targets. *Cell Cycle*, *13*(2), 268–278. <https://doi.org/10.4161/cc.27031>
- Green, D. E. (1936). α -Glycerophosphate dehydrogenase. *Biochemical Journal*, *30*(4), 629–644.
- Grüning, N.-M., Rinnerthaler, M., Bluemlein, K., Müllleder, M., Wamelink, M. M. C., Lehrach, H., Jakobs, C., Breitenbach, M., & Ralser, M. (2011). Pyruvate kinase triggers a metabolic feedback loop that controls redox metabolism in respiring cells. *Cell Metabolism*, *14*(3), 415–427. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.017>
- Haeckel, E. H. P. A. (1872). *Natürliche Schöpfungsgeschichte*. Verlag von Georg Keimer.
- Haeckel, E. H. P. A. (1877). *Anthropogenie*. W. Engelmann.
- Hakimi, P., Johnson, M. T., Yang, J., Lepage, D. F., Conlon, R. A., Kalhan, S. C., Reshef, L., Tilghman, S. M., & Hanson, R. W. (2005). Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the critical role of cataplerosis in the control of hepatic metabolism. *Nutrition & Metabolism*, *2*(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-33>

- Hammoud, M., Vlaski, M., Duchez, P., Chevaleyre, J., Lafarge, X., Boiron, J.-M., Praloran, V., Brunet De La Grange, P., & Ivanovic, Z. (2012). Combination of low O₂ concentration and mesenchymal stromal cells during culture of cord blood CD34(+) cells improves the maintenance and proliferative capacity of hematopoietic stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 227(6), 2750–2758. <https://doi.org/10.1002/jcp.23019>
- Hanske, J., Toffey, J. R., Morenz, A. M., Bonilla, A. J., Schiavoni, K. H., & Pletneva, E. V. (2012). Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(1), 125–130. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112312108>
- Hardie, D. G., & Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase—Fuel gauge of the mammalian cell? *European Journal of Biochemistry*, 246(2), 259–273. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00259.x>
- Hare, J. M., Traverse, J. H., Henry, T. D., Dib, N., Strumpf, R. K., Schulman, S. P., Gerstenblith, G., DeMaria, A. N., Denktas, A. E., Gammon, R. S., Hermiller, J. B., Reisman, M. A., Schaer, G. L., & Sherman, W. (2009). A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study of Intravenous Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal) After Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(24), 2277–2286. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.06.055>
- Harrison, J. S., Rameshwar, P., Chang, V., & Bandari, P. (2002). Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood*, 99(1), 394. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.1.394>
- Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I. (1992). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 13(1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(92\)90364-3](https://doi.org/10.1016/8756-3282(92)90364-3)
- Hemmati, H. D., Nakano, I., Lazareff, J. A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D. H., Bronner-Fraser, M., & Kornblum, H. I. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 15178–15183. <https://doi.org/10.1073/pnas.2036535100>
- Hemphill, J. C., Smith, W. S., Sonne, D. C., Morabito, D., & Manley, G. T. (2005). Relationship between brain tissue oxygen tension and CT perfusion: Feasibility and initial results. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 26(5), 1095–1100.
- Hermitte, F., Brunet de la Grange, P., Belloc, F., Praloran, V., & Ivanovic, Z. (2006). Very Low O₂ Concentration (0.1%) Favors G₀ Return of Dividing CD34+ Cells. *Stem Cells*, 24(1), 65–73. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0351>
- Hevehan, D. L., Papoutsakis, E. T., & Miller, W. M. (2000). Physiologically significant effects of pH and oxygen tension on granulopoiesis. *Experimental Hematology*, 28(3), 267–275. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(99\)00150-2](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(99)00150-2)
- Hiltunen, J. K., Autio, K. J., Schonauer, M. S., Kursu, V. A. S., Dieckmann, C. L., & Kastaniotis, A. J. (2010). Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(6), 1195–1202. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.006>
- Hine, C., Harputlugil, E., Zhang, Y., Ruckenstuhl, C., Lee, B. C., Brace, L., Longchamp, A., Treviño-Villarreal, J. H., Mejia, P., Ozaki, C. K., Wang, R., Gladyshev, V. N., Madeo, F., Mair, W. B., & Mitchell, J. R. (2015). Endogenous Hydrogen Sulfide Production Is Essential for Dietary Restriction Benefits. *Cell*, 160(1), 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.048>
- Hirayama, A., Kami, K., Sugimoto, M., Sugawara, M., Toki, N., Onozuka, H., Kinoshita, T., Saito, N., Ochiai, A., Tomita, M., Esumi, H., & Soga, T. (2009). Quantitative Metabolome Profiling of Colon and Stomach Cancer Microenvironment by Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Cancer Research*, 69(11), 4918–4925. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4806>
- Hirst, J., & Roessler, M. M. (2016). Energy conversion, redox catalysis and generation of reactive oxygen species by respiratory complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(7), 872–883. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.12.009>

- Hoekstra, A. S., & Bayley, J.-P. (2013). The role of complex II in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(5), 543–551. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.005>
- Holland, H. D. (2006). The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1470), 903–915. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1838>
- Holzwarth, C., Vaegler, M., Gieseke, F., Pfister, S. M., Handgretinger, R., Kerst, G., & Müller, I. (2010). Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biology*, 11(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-11>
- Honzarenko, M., Le, Y., Swierkowski, M., Ghiran, I., Glodek, A. M., & Silberstein, L. E. (2006). Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(4), 1030–1041. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0319>
- Hosios, A. M., & Heiden, M. G. V. (2018). The redox requirements of proliferating mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 293(20), 7490–7498. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000239>
- Hrdy, I., Hirt, R. P., Dolezal, P., Bardonová, L., Foster, P. G., Tachezy, J., & Embley, T. M. (2004). Trichomonas hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature*, 432(7017), 618–622. <https://doi.org/10.1038/nature03149>
- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L. A., Keith, B., & Simon, M. C. (2003). Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in Hypoxic Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 23(24), 9361–9374. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003>
- Huang, J., & Xie, Y. (2023). Hydrogen Sulfide Signaling in Plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 39(1–3), 40–58. <https://doi.org/10.1089/ars.2023.0267>
- Hume, D. A., & Weidemann, M. J. (1979). Role and regulation of glucose metabolism in proliferating cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 62(1), 3–8.
- Hunter, F. E. (1949). Anaerobic phosphorylation due to a coupled oxidation-reduction between alpha-ketoglutaric acid and oxalacetic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 177(1), 361–372.
- Idell-Wenger, J. A., Grotyohann, L. W., & Neely, J. R. (1978). Coenzyme A and carnitine distribution in normal and ischemic hearts. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(12), 4310–4318.
- Ikuta, K., & Weissman, I. L. (1992). Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(4), 1502–1506. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1502>
- Ilangovan, G., Liebgott, T., Kutala, V. K., Petryakov, S., Zweier, J. L., & Kuppasamy, P. (2004). EPR oximetry in the beating heart: Myocardial oxygen consumption rate as an index of postischemic recovery. *Magnetic Resonance in Medicine*, 51(4), 835–842. <https://doi.org/10.1002/mrm.20000>
- Imamura, K., & Tanaka, T. (1982). Pyruvate kinase isozymes from rat. *Methods in Enzymology*, 90 Pt E, 150–165. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(82\)90121-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(82)90121-5)
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., Ikeda, Y., Mak, T. W., & Suda, T. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 431(7011), Article 7011. <https://doi.org/10.1038/nature02989>
- Ito, K., & Suda, T. (2014). Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrm3772>
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., & Kaelin Jr., W. G. (2001). HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing. *Science*, 292(5516), 464–468. <https://doi.org/10.1126/science.1059817>
- Ivanović, Bartolozzi, Bernabei, Cipolleschi, Rovida, Milenković, Praloran, & Dello Sbarba. (2000). Incubation of murine bone marrow cells in hypoxia ensures the maintenance of marrow-

- repopulating ability together with the expansion of committed progenitors. *British Journal of Haematology*, 108(2), 424–429. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.01842.x>
- Ivanovic, Z. (2009). Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *Journal of Cellular Physiology*, 219(2), 271–275. <https://doi.org/10.1002/jcp.21690>
- Ivanovic, Z. (2023). Mesenchymal - Stem and non-Stem - Cells: The Name of the Rose. *Transfusion Clinique Et Biologique: Journal De La Societe Francaise De Transfusion Sanguine*, S1246-7820(23)00042-3. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2023.03.006>
- Ivanovic, Z., Belloc, F., Faucher, J.-L., Cipolleschi, M.-G., Praloran, V., & Dello Sbarba, P. D. (2002). Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34+ murine bone marrow cells. *Experimental Hematology*, 30(1), 67–73. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00765-2](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00765-2)
- Ivanovic, Z., Hermitte, F., de la Grange, P. B., Dazey, B., Belloc, F., Lacombe, F., Vezon, G., & Praloran, V. (2004). Simultaneous Maintenance of Human Cord Blood SCID-Repopulating Cells and Expansion of Committed Progenitors at Low O₂ Concentration (3%). *Stem Cells*, 22(5), 716–724. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-716>
- Ivanović, Z., Dello Sbarba, P. D., Trimoreau, F., Faucher, J.-L., & Praloran, V. (2000). Primitive human HPCs are better maintained and expanded in vitro at 1 percent oxygen than at 20 percent. *Transfusion*, 40(12), 1482–1488. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2000.40121482.x>
- Ivanovic, Z., & Vlaski-Lafarge, M. (Eds.). (2016). Front Matter. In *Anaerobiosis and Stemness* (p. iii). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800540-8.01001-2>
- Iwasaki, H., & Akashi, K. (2007). Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity*, 26(6), 726–740. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.06.004>
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., & Semenza, G. L. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes & Development*, 12(2), 149–162. <https://doi.org/10.1101/gad.12.2.149>
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y.-M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A. von, Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, † Christopher W., & Ratcliffe, † Peter J. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science*, 292(5516), 468–472. <https://doi.org/10.1126/science.1059796>
- Jackson, M. R., Loll, P. J., & Jorns, M. S. (2019). X-Ray Structure of Human Sulfide:Quinone Oxidoreductase: Insights into the Mechanism of Mitochondrial Hydrogen Sulfide Oxidation. *Structure (London, England : 1993)*, 27(5), 794-805.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.03.002>
- Jacobson, L. O., Marks, E. K., Gaston, E. O., Robson, M., & Zirkle, R. E. (1949). The Role of the Spleen in Radiation Injury. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 70(4), 740–742. <https://doi.org/10.3181/00379727-70-17053>
- Jacque, N., Ronchetti, A. M., Larrue, C., Meunier, G., Birsén, R., Willems, L., Saland, E., Decroocq, J., Maciel, T. T., Lambert, M., Poulain, L., Hospital, M. A., Sujobert, P., Joseph, L., Chapuis, N., Lacombe, C., Moura, I. C., Demo, S., Sarry, J. E., ... Bouscary, D. (2015). Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood*, 126(11), 1346–1356. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-621870>
- Jendelová, P., Kubinová, Š., Sandvig, I., Erceg, S., Sandvig, A., & Syková, E. (2016). Current developments in cell- and biomaterial-based approaches for stroke repair. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 16(1), 43–56. <https://doi.org/10.1517/14712598.2016.1094457>
- Jenhani, F., Durand, V., Ben Azouna, N., Thallet, S., Ben Othmen, T., Bejaoui, M., & Domenech, J. (2011). Human cytokine expression profile in various conditioned media for in vitro expansion bone marrow and umbilical cord blood immunophenotyped mesenchymal stem cells. *Transplantation Proceedings*, 43(2), 639–643. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.01.021>

- Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1991). The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annual Review of Medicine*, 42, 225–246. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.42.020191.001301>
- Jia, J., Wang, Z., Zhang, M., Huang, C., Song, Y., Xu, F., Zhang, J., Li, J., He, M., Li, Y., Ao, G., Hong, C., Cao, Y., Chin, Y. E., Hua, Z.-C., & Cheng, J. (2020). SQR mediates therapeutic effects of H2S by targeting mitochondrial electron transport to induce mitochondrial uncoupling. *Science Advances*, 6(35), eaaz5752. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz5752>
- Jin, Y., Kato, T., Furu, M., Nasu, A., Kajita, Y., Mitsui, H., Ueda, M., Aoyama, T., Nakayama, T., Nakamura, T., & Toguchida, J. (2010). Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(3), 1471–1476. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.096>
- Johnson, P. C., Vandegriff, K., Tsai, A. G., & Intaglietta, M. (2005). Effect of acute hypoxia on microcirculatory and tissue oxygen levels in rat cremaster muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 98(4), 1177–1184. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00591.2004>
- Joshi, V., Lakhani, S. R., & McCart Reed, A. E. (2022). NDRG1 in Cancer: A Suppressor, Promoter, or Both? *Cancers*, 14(23), 5739. <https://doi.org/10.3390/cancers14235739>
- Jungermann, K., & Kietzmann, T. (1997). Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney International*, 51(2), 402–412. <https://doi.org/10.1038/ki.1997.53>
- Kabil, O., Yadav, V., & Banerjee, R. (2016). Heme-dependent Metabolite Switching Regulates H2S Synthesis in Response to Endoplasmic Reticulum (ER) Stress * ♦. *Journal of Biological Chemistry*, 291(32), 16418–16423. <https://doi.org/10.1074/jbc.C116.742213>
- Kaelin, W. G. (2005). Proline Hydroxylation and Gene Expression. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 115–128. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133142>
- Kaelin, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: The central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell*, 30(4), 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009>
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 298, 229–317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R. C., & Conaway, J. W. (2000). Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(19), 10430–10435. <https://doi.org/10.1073/pnas.190332597>
- Katsyuba, E., Romani, M., Hofer, D., & Auwerx, J. (2020). NAD⁺ homeostasis in health and disease. *Nature Metabolism*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0161-5>
- Katz, J., & Tayek, J. A. (1999). Recycling of glucose and determination of the Cori Cycle and gluconeogenesis. *The American Journal of Physiology*, 277(3), E401–407. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.277.3.E401>
- Katzen, H. M., & Schimke, R. T. (1965). Multiple forms of hexokinase in the rat: Tissue distribution, age dependency, and properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(4), 1218–1225. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.4.1218>
- Kaunitz, J. D. (1991). Localizing glucose transport proteins: Active investigation of passive carriers. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 13(4), 800–802. <https://doi.org/10.1002/hep.1840130430>
- Khaidizar, F. D., Bessho, Y., & Nakahata, Y. (2021). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase as a Key Molecule of the Aging/Senescence Process. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijms22073709>
- Khan, M., Nickoloff, E., Abramova, T., Johnson, J., Verma, S. K., Krishnamurthy, P., Mackie, A. R., Vaughan, E., Garikipati, V. N. S., Benedict, C., Ramirez, V., Lambers, E., Ito, A., Gao, E., Misener, S., Luongo, T., Elrod, J., Qin, G., Houser, S. R., ... Kishore, R. (2015). Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following

- myocardial infarction. *Circulation Research*, 117(1), 52–64. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305990>
- Kiani, A. A., Kazemi, A., Halabian, R., Mohammadipour, M., Jahanian-Najafabadi, A., & Roudkenar, M. H. (2013). HIF-1 α confers resistance to induced stress in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Archives of Medical Research*, 44(3), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.03.006>
- Kiel, M. J., & Morrison, S. J. (2008). Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nature Reviews. Immunology*, 8(4), 290–301. <https://doi.org/10.1038/nri2279>
- Kirkwood, T. B. L., & Austad, S. N. (2000). Why do we age? *Nature*, 408(6809), Article 6809. <https://doi.org/10.1038/35041682>
- Kirsch, J. R., D'Alecy, L. G., & Mongroo, P. B. (1980). Butanediol induced ketosis increases tolerance to hypoxia in the mouse. *Stroke*, 11(5), 506–513. <https://doi.org/10.1161/01.STR.11.5.506>
- Kisker, C., Schindelin, H., Pacheco, A., Wehbi, W. A., Garrett, R. M., Rajagopalan, K. V., Enemark, J. H., & Rees, D. C. (1997). Molecular Basis of Sulfite Oxidase Deficiency from the Structure of Sulfite Oxidase. *Cell*, 91(7), 973–983. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80488-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80488-2)
- Kita, K., Hirawake, H., Miyadera, H., Amino, H., & Takeo, S. (2002). Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1553(1), 123–139. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00237-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00237-7)
- Klimmeck, D., Hansson, J., Raffel, S., Vakhrushev, S. Y., Trumpp, A., & Krijgsveld, J. (2012). Proteomic Cornerstones of Hematopoietic Stem Cell Differentiation: Distinct Signatures of Multipotent Progenitors and Myeloid Committed Cells *. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(8), 286–302. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.016790>
- Klingenberg, M. (1970). Localization of the glycerol-phosphate dehydrogenase in the outer phase of the mitochondrial inner membrane. *European Journal of Biochemistry*, 13(2), 247–252. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb00924.x>
- Kocabas, F., Zheng, J., Thet, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., DeBerardinis, R. J., Zhang, C., & Sadek, H. A. (2012). Meis1 regulates the metabolic phenotype and oxidant defense of hematopoietic stem cells. *Blood*, 120(25), 4963–4972. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-432260>
- Kohli, L., & Passegué, E. (2014). Surviving change: The metabolic journey of hematopoietic stem cells. *Trends in Cell Biology*, 24(8), 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.04.001>
- Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2012). Stem cell repair of striatal ischemia. *Progress in Brain Research*, 201, 35–53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59544-7.00003-2>
- Koller, M., Bender, J., Papoutsakis, E., & Miller, W. (1992). Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen, and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors. *Blood*, 80(2), 403–411. <https://doi.org/10.1182/blood.V80.2.403.403>
- Koller, M. R., Bender, J. G., Miller, W. M., & Papoutsakis, E. T. (1992). Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. *Experimental Hematology*, 20(2), 264–270.
- Konopleva, M., Tabe, Y., Zeng, Z., & Andreeff, M. (2009). Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: Mechanisms and approaches. *Drug Resistance Updates*, 12(4), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2009.06.001>
- Kopp, H.-G., Avecilla, S. T., Hooper, A. T., & Rafii, S. (2005). The Bone Marrow Vascular Niche: Home of HSC Differentiation and Mobilization. *Physiology*, 20(5), 349–356. <https://doi.org/10.1152/physiol.00025.2005>
- Kovačević-Filipović, M., Petakov, M., Hermitte, F., Debeissat, C., Krstić, A., Jovčić, G., Bugarski, D., Lafarge, X., Milenković, P., Praloran, V., & Ivanović, Z. (2007). Interleukin-6 (IL-6) and low O₂ concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (pre-CFC). *Journal of Cellular Physiology*, 212(1), 68–75. <https://doi.org/10.1002/jcp.21003>
- Koza, R. A., Kozak, U. C., Brown, L. J., Leiter, E. H., Macdonald, M. J., & Kozak, L. P. (1996). Sequence and Tissue-Dependent RNA Expression of Mouse FAD-Linked Glycerol-3-Phosphate

- Dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 336(1), 97–104. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0536>
- Kranz, R. G., Richard-Fogal, C., Taylor, J.-S., & Frawley, E. R. (2009). Cytochrome c Biogenesis: Mechanisms for Covalent Modifications and Trafficking of Heme and for Heme-Iron Redox Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(3), 510–528. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00001-09>
- Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., & May, W. S. (1996). CD34: Structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87(1), 1–13.
- Krebs, H. A. (1936). Intermediate Metabolism of Carbohydrates. *Nature*, 138(3485), Article 3485. <https://doi.org/10.1038/138288b0>
- Krebs, H. A. (1940). The citric acid cycle. *Biochemical Journal*, 34(3), 460–463.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Krogh, A. (1919). The supply of oxygen to the tissues and the regulation of the capillary circulation. *The Journal of Physiology*, 52(6), 457–474.
- Kudo, N., Barr, A. J., Barr, R. L., Desai, S., & Lopaschuk, G. D. (1995). High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(29), 17513–17520. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17513>
- Kumar, R., & Banerjee, R. (2021). Regulation of the redox metabolome and thiol proteome by hydrogen sulfide. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 56(3), 221–235. <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1893641>
- Kumar, R., Landry, A. P., Guha, A., Vitvitsky, V., Lee, H. J., Seike, K., Reddy, P., Lyssiotis, C. A., & Banerjee, R. (2021). A redox cycle with complex II promotes sulfide quinone oxidoreductase dependent H₂S oxidation (p. 2021.09.08.459449). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.09.08.459449>
- Kump, L. R. (2008). The rise of atmospheric oxygen. *Nature*, 451(7176), Article 7176. <https://doi.org/10.1038/nature06587>
- Kurland, C. G., & Andersson, S. G. (2000). Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 64(4), 786–820. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.786-820.2000>
- L, K. H. (1966). Anaplerotic sequences and their role in metabolism. *Essays Biochem.*, 2, 1–31.
- Lagoutte, E., Mimoun, S., Andriamihaja, M., Chaumontet, C., Blachier, F., & Bouillaud, F. (2010). Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1797(8), 1500–1511. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.04.004>
- Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S. K., Choo, A., Chen, T. S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C. N., El Oakley, R. M., Pasterkamp, G., de Kleijn, D. P. V., & Lim, S. K. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, 4(3), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.12.003>
- Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L., & Bruick, R. K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & Development*, 16(12), 1466–1471. <https://doi.org/10.1101/gad.991402>
- Langsjoen, P. H., & Langsjoen, A. M. (2003). The clinical use of HMG CoA-reductase inhibitors and the associated depletion of coenzyme Q10. A review of animal and human publications. *BioFactors*, 18(1–4), 101–111. <https://doi.org/10.1002/biof.5520180212>
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., & Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645–648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>
- Latil, M., Rocheteau, P., Châtre, L., Sanulli, S., Mémet, S., Ricchetti, M., Tajbakhsh, S., & Chrétien, F. (2012). Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain

- regenerative capacity. *Nature Communications*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms1890>
- Lau, T. T., & Wang, D.-A. (2011). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): Homing factor for engineered regenerative medicine. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11(2), 189–197. <https://doi.org/10.1517/14712598.2011.546338>
- Lee, C., Mitsialis, S. A., Aslam, M., Vitali, S. H., Vergadi, E., Konstantinou, G., Sdrimas, K., Fernandez-Gonzalez, A., & Kourembanas, S. (2012). Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 126(22), 2601–2611. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.114173>
- Lee, H. J., Ryu, J. M., Jung, Y. H., Oh, S. Y., Lee, S.-J., & Han, H. J. (2015). Novel Pathway for Hypoxia-Induced Proliferation and Migration in Human Mesenchymal Stem Cells: Involvement of HIF-1 α , FASN, and mTORC1. *Stem Cells*, 33(7), 2182–2195. <https://doi.org/10.1002/stem.2020>
- Lee, H., Smith, S. B., & Yoon, Y. (2017). The short variant of the mitochondrial dynamin OPA1 maintains mitochondrial energetics and cristae structure. *Journal of Biological Chemistry*, 292(17), 7115–7130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.762567>
- Lee, Y. M., Jeong, C.-H., Koo, S.-Y., Son, M. J., Song, H. S., Bae, S.-K., Raleigh, J. A., Chung, H.-Y., Yoo, M.-A., & Kim, K.-W. (2001). Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: A possible signal for vessel development. *Developmental Dynamics*, 220(2), 175–186. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(20010201\)220:2<175::AID-DVDY1101>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1097-0177(20010201)220:2<175::AID-DVDY1101>3.0.CO;2-F)
- Lei, B., Lionetti, V., Young, M. E., Chandler, M. P., d'Agostino, C., Kang, E., Altarejos, M., Matsuo, K., Hintze, T. H., Stanley, W. C., & Recchia, F. A. (2004). Paradoxical downregulation of the glucose oxidation pathway despite enhanced flux in severe heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 36(4), 567–576. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.02.004>
- Leschelle, X., Gubern, M., Andriamihaja, M., Blottière, H. M., Couplan, E., Gonzalez-Barroso, M.-M., Petit, C., Pagniez, A., Chaumontet, C., Mignotte, B., Bouillaud, F., & Blachier, F. (2005). Adaptative metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1725(2), 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.06.002>
- Lesnefsky, E. J., Chen, Q., Tandler, B., & Hoppel, C. L. (2017). Mitochondrial Dysfunction and Myocardial Ischemia-Reperfusion: Implications for Novel Therapies. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57(1), 535–565. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103335>
- Lesnefsky, E. J., Slabe, T. J., Stoll, M. S., Minkler, P. E., & Hoppel, C. L. (2001). Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 280(6), H2770-2778. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2770>
- Lesnefsky, E. J., Tandler, B., Ye, J., Slabe, T. J., Turkaly, J., & Hoppel, C. L. (1997). Myocardial ischemia decreases oxidative phosphorylation through cytochrome oxidase in subsarcolemmal mitochondria. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 273(3), H1544–H1554. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.3.H1544>
- Levitt, M. D., Abdel-Rehim, M. S., & Furne, J. (2011). Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: Anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(2), 373–378. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3525>
- Lewis, G. D., Farrell, L., Wood, M. J., Martinovic, M., Arany, Z., Rowe, G. C., Souza, A., Cheng, S., McCabe, E. L., Yang, E., Shi, X., Deo, R., Roth, F. P., Asnani, A., Rhee, E. P., Systrom, D. M., Semigran, M. J., Vasan, R. S., Carr, S. A., ... Gerszten, R. E. (2010). Metabolic Signatures of Exercise in Human Plasma. *Science Translational Medicine*, 2(33), 33ra37. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001006>
- Li, C., Love, G. D., Lyons, T. W., Fike, D. A., Sessions, A. L., & Chu, X. (2010). A Stratified Redox Model for the Ediacaran Ocean. *Science*, 328(5974), 80–83. <https://doi.org/10.1126/science.1182369>
- Li, L., Whiteman, M., Guan, Y. Y., Neo, K. L., Cheng, Y., Lee, S. W., Zhao, Y., Baskar, R., Tan, C.-H., & Moore, P. K. (2008). Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing

- molecule (GYY4137): New insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*, 117(18), 2351–2360. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.753467>
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*, 91(4), 479–489. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80434-1)
- Libiad, M., Sriraman, A., & Banerjee, R. (2015). Polymorphic Variants of Human Rhodanese Exhibit Differences in Thermal Stability and Sulfur Transfer Kinetics *. *Journal of Biological Chemistry*, 290(39), 23579–23588. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.675694>
- Lidonnici, M. R., Aprile, A., Frittoli, M. C., Mandelli, G., Paleari, Y., Spinelli, A., Gentner, B., Zambelli, M., Parisi, C., Bellio, L., Cassinerio, E., Zanaboni, L., Cappellini, M. D., Ciceri, F., Markt, S., & Ferrari, G. (2017). Plerixafor and G-CSF combination mobilizes hematopoietic stem and progenitor cells with a distinct transcriptional profile and a reduced in vivo homing capacity compared to plerixafor alone. *Haematologica*, 102(4), e120–e124. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.154740>
- Lin, C.-S., Xin, Z.-C., Dai, J., & Lue, T. F. (2013). Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histology and Histopathology*, 28(9), 1109–1116. <https://doi.org/10.14670/HH-28.1109>
- Lin, S.-C., & Hardie, D. G. (2018). AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metabolism*, 27(2), 299–313. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.009>
- Lindvall, O., & Kokaia, Z. (2011). Stem cell research in stroke: How far from the clinic? *Stroke*, 42(8), 2369–2375. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.599654>
- Linkermann, A., Stockwell, B. R., Krautwald, S., & Anders, H.-J. (2014). Regulated cell death and inflammation: An auto-amplification loop causes organ failure. *Nature Reviews Immunology*, 14(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nri3743>
- Liu, L., Papa, E. F., Dooner, M. S., Machan, J. T., Johnson, K. W., Goldberg, L. R., Quesenberry, P. J., & Colvin, G. A. (2012). Homing and Long-Term Engraftment of Long- and Short-Term Renewal Hematopoietic Stem Cells. *PLOS ONE*, 7(2), e31300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031300>
- Liu, S., Fu, S., Wang, G., Cao, Y., Li, L., Li, X., Yang, J., Li, N., Shan, Y., Cao, Y., Ma, Y., Dong, M., Liu, Q., & Jiang, H. (2021). Glycerol-3-phosphate biosynthesis regenerates cytosolic NAD⁺ to alleviate mitochondrial disease. *Cell Metabolism*, 33(10), 1974–1987.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.06.013>
- Liu, S., Neidhardt, E. A., Grossman, T. H., Ocain, T., & Clardy, J. (2000). Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. *Structure (London, England: 1993)*, 8(1), 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00077-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00077-0)
- Liu, Y.-L., Yu, J.-M., Song, X.-R., Wang, X.-W., Xing, L.-G., & Gao, B.-B. (2006). Regulation of the chemokine receptor CXCR4 and metastasis by hypoxia-inducible factor in non small cell lung cancer cell lines. *Cancer Biology & Therapy*, 5(10), 1320–1326. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.10.3162>
- LIVINGSTONE, D. R. (1991). Origins and Evolution of Pathways of Anaerobic Metabolism in the Animal Kingdom. *American Zoologist*, 31(3), 522–534. <https://doi.org/10.1093/icb/31.3.522>
- Lloyd, D. (1996). Obligate anaerobe or not? *Nature*, 381(6578), Article 6578. <https://doi.org/10.1038/381121a0>
- Lo Surdo, J., & Bauer, S. R. (2012). Quantitative approaches to detect donor and passage differences in adipogenic potential and clonogenicity in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 18(11), 877–889. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2011.0736>
- Loncaric, D., Labat, V., Debeissat, C., Brunet de la Grange, P., Rodriguez, L., Vlaski-Lafarge, M., & Ivanovic, Z. (2019). The majority of cells in so-called “mesenchymal stem cell” population are neither stem cells nor progenitors. *Transfusion Clinique Et Biologique: Journal De La Societe*

- Francaise De Transfusion Sanguine*, 26(4), 316–323.
<https://doi.org/10.1016/j.tracli.2018.08.157>
- Lord, B. I., Testa, N. G., & Hendry, J. H. (1975). The Relative Spatial Distributions of CFUs and CFUc in the Normal Mouse Femur. *Blood*, 46(1), 65–72. <https://doi.org/10.1182/blood.V46.1.65.65>
- Lotfinia, M., Lak, S., Mohammadi Ghahhari, N., Johari, B., Maghsood, F., Parsania, S., Sadegh Tabrizi, B., & Kadivar, M. (2017). Hypoxia Pre-Conditioned Embryonic Mesenchymal Stem Cell Secretome Reduces IL-10 Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Iranian Biomedical Journal*, 21(1), 24–31. <https://doi.org/10.6091/.21.1.24>
- Lowry, O. H., & Passonneau, J. V. (1964). THE RELATIONSHIPS BETWEEN SUBSTRATES AND ENZYMES OF GLYCOLYSIS IN BRAIN. *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 31–42.
- Lu, L., & Broxmeyer, H. E. (1985). Comparative influences of phytohemagglutinin-stimulated leukocyte conditioned medium, hemin, prostaglandin E, and low oxygen tension on colony formation by erythroid progenitor cells in normal human bone marrow. *Experimental Hematology*, 13(10), 989–993.
- Luna-Sánchez, M., Hidalgo-Gutiérrez, A., Hildebrandt, T. M., Chaves-Serrano, J., Barriocanal-Casado, E., Santos-Fandila, Á., Romero, M., Sayed, R. K., Duarte, J., Prokisch, H., Schuelke, M., Distelmaier, F., Escames, G., Acuña-Castroviejo, D., & López, L. C. (2017). CoQ deficiency causes disruption of mitochondrial sulfide oxidation, a new pathomechanism associated with this syndrome. *EMBO Molecular Medicine*, 9(1), 78–95. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606345>
- Lunt, S. Y., & Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>
- Lyons, T. W., Reinhard, C. T., & Planavsky, N. J. (2014). The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature*, 506(7488), Article 7488. <https://doi.org/10.1038/nature13068>
- Mahon, P. C., Hirota, K., & Semenza, G. L. (2001). FIH-1: A novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes & Development*, 15(20), 2675–2686. <https://doi.org/10.1101/gad.924501>
- Majeti, R., Park, C. Y., & Weissman, I. L. (2007). Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell*, 1(6), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.001>
- Majka, M., Kleibert, M., & Wojciechowska, M. (2021). Impact of the Main Cardiovascular Risk Factors on Plasma Extracellular Vesicles and Their Influence on the Heart's Vulnerability to Ischemia-Reperfusion Injury. *Cells*, 10, 3331. <https://doi.org/10.3390/cells10123331>
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., & Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414(6863), Article 6863. <https://doi.org/10.1038/35107085>
- Makinodan, T. (1956). Circulating rat cells in lethally irradiated mice protected with rat bone marrow. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 92(1), 174–179. <https://doi.org/10.3181/00379727-92-22421>
- Marcia, M., Ermler, U., Peng, G., & Michel, H. (2010). A new structure-based classification of sulfide:quinone oxidoreductases. *Proteins*, 78(5), 1073–1083. <https://doi.org/10.1002/prot.22665>
- Marsin, A. S., Bertrand, L., Rider, M. H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M. F., Van den Berghe, G., Carling, D., & Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current Biology: CB*, 10(20), 1247–1255. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00742-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00742-9)
- Martinaud, C., Desterke, C., & Le Bousse-Kerdilès, M.-C. (2017). Physiopathologie des néoplasies myéloprolifératives ; quand le microenvironnement s'enflamme ! *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2017(492), 41–50. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(17\)30163-6](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(17)30163-6)

- Martin-Rendon, E., & Watt, S. M. (2003). Stem cell plasticity. *British Journal of Haematology*, *122*(6), 877–891. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04576.x>
- Marzi, I., Cipolleschi, M. G., D'Amico, M., Stivarou, T., Rovida, E., Vinci, M. C., Pandolfi, S., Dello Sbarba, P., Stecca, B., & Olivotto, M. (2013). The involvement of a Nanog, Klf4 and c-Myc transcriptional circuitry in the intertwining between neoplastic progression and reprogramming. *Cell Cycle*, *12*(2), 353–364. <https://doi.org/10.4161/cc.23200>
- Masala, E., Valencia-Martinez, A., Pillozzi, S., Rondelli, T., Brogi, A., Sanna, A., Gozzini, A., Arcangeli, A., Dello Sbarba, P. D., & Santini, V. (2018). Severe hypoxia selects hematopoietic progenitors with stem cell potential from primary Myelodysplastic syndrome bone marrow cell cultures. *Oncotarget*, *9*(12), 10561–10571. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24302>
- Massabuau, J. C., & Burtin, B. (1984). Regulation of oxygen consumption in the crayfish *Astacus leptodactylus* at different levels of oxygenation: Role of peripheral O₂ chemoreception. *Journal of Comparative Physiology B*, *155*(1), 43–49. <https://doi.org/10.1007/BF00688790>
- Massabuau, J.-C., Burtin, B., & Wheathly, M. (1991). How is O₂ consumption maintained independent of ambient oxygen in mussel *Anodonta cygnea*? *Respiration Physiology*, *83*(1), 103–113. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(91\)90096-2](https://doi.org/10.1016/0034-5687(91)90096-2)
- Maximow, A. A. (1924). RELATION OF BLOOD CELLS TO CONNECTIVE TISSUES AND ENDOTHELIUM. *Physiological Reviews*, *4*(4), 533–563. <https://doi.org/10.1152/physrev.1924.4.4.533>
- Maynard, M. A., Evans, A. J., Shi, W., Kim, W. Y., Liu, F.-F., & Ohh, M. (2007). Dominant-Negative HIF-3 α 4 Suppresses VHL-Null Renal Cell Carcinoma Progression. *Cell Cycle*, *6*(22), 2810–2816. <https://doi.org/10.4161/cc.6.22.4947>
- Mazari, A. M. A., Zhang, L., Ye, Z.-W., Zhang, J., Tew, K. D., & Townsend, D. M. (2023). The Multifaceted Role of Glutathione S-Transferases in Health and Disease. *Biomolecules*, *13*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/biom13040688>
- Mazo, M., Hernández, S., Gavira, J. J., Abizanda, G., Araña, M., López-Martínez, T., Moreno, C., Merino, J., Martino-Rodríguez, A., Uixeira, A., García de Jalón, J. A., Pastrana, J., Martínez-Caro, D., & Prósper, F. (2012). Treatment of reperfused ischemia with adipose-derived stem cells in a preclinical Swine model of myocardial infarction. *Cell Transplantation*, *21*(12), 2723–2733. <https://doi.org/10.3727/096368912X638847>
- McKenzie, J. L., Takenaka, K., Gan, O. I., Doedens, M., & Dick, J. E. (2006). Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin-CD34+CD38- population. *Blood*, *109*(2), 543–545. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-030270>
- McKinley, B. A., & Butler, B. D. (1999). Comparison of skeletal muscle PO₂, PCO₂, and pH with gastric tonometric PCO₂ and pH in hemorrhagic shock. *Critical Care Medicine*, *27*(9), 1869.
- Meagher, R., Salvado, A., & Wright, D. (1988). An analysis of the multilineage production of human hematopoietic progenitors in long-term bone marrow culture: Evidence that reactive oxygen intermediates derived from mature phagocytic cells have a role in limiting progenitor cell self-renewal. *Blood*, *72*(1), 273–281. <https://doi.org/10.1182/blood.V72.1.273.273>
- Meirelles, L. da S., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, *119*(11), 2204–2213. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>
- Memon, I. A., Sawa, Y., Fukushima, N., Matsumiya, G., Miyagawa, S., Taketani, S., Sakakida, S. K., Kondoh, H., Aleshin, A. N., Shimizu, T., Okano, T., & Matsuda, H. (2005). Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *130*(5), 1333–1341. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2005.07.023>
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., MacArthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N., & Frenette, P. S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, *466*(7308), 829–834. <https://doi.org/10.1038/nature09262>
- Mereschkowsky, C. (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol Centralbl*, *25*, 593.

- Metallo, C. M., Gameiro, P. A., Bell, E. L., Mattaini, K. R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C. M., Johnson, Z. R., Irvine, D. J., Guarente, L., Kelleher, J. K., Vander Heiden, M. G., Iliopoulos, O., & Stephanopoulos, G. (2012). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*, *481*(7381), Article 7381. <https://doi.org/10.1038/nature10602>
- Mi-ichi, F., Yousuf, M. A., Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2009). Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(51), 21731–21736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907106106>
- Mik, E. G., van Leeuwen, T. G., Raat, N. J., & Ince, C. (2004). Quantitative determination of localized tissue oxygen concentration in vivo by two-photon excitation phosphorescence lifetime measurements. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *97*(5), 1962–1969. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01399.2003>
- Miller, S. L., & Urey, H. C. (1959). Organic Compound Synthesis on the Primitive Earth. *Science*, *130*(3370), 245–251. <https://doi.org/10.1126/science.130.3370.245>
- Milne, J. L. S. (2013). Structure and Regulation of Pyruvate Dehydrogenases. In W. J. Lennarz & M. D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)* (pp. 321–328). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00079-7>
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, *191*, 144–148. <https://doi.org/10.1038/191144a0>
- Modo, M., Ambrosio, F., Friedlander, R. M., Badylak, S. F., & Wechsler, L. R. (2013). Bioengineering solutions for neural repair and recovery in stroke. *Current Opinion in Neurology*, *26*(6), 626. <https://doi.org/10.1097/WCO.000000000000031>
- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., & Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: A critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*, *7*(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.007>
- Mokarizadeh, A., Delirez, N., Morshedi, A., Mosayebi, G., Farshid, A.-A., & Mardani, K. (2012). Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: Potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunology Letters*, *147*(1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.06.001>
- Molyneux, S. L., Florkowski, C. M., George, P. M., Pilbrow, A. P., Frampton, C. M., Lever, M., & Richards, A. M. (2008). Coenzyme Q10. *Journal of the American College of Cardiology*, *52*(18), 1435–1441. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.07.044>
- Moreb, J. S. (2008). Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, *3*(4), 237–246. <https://doi.org/10.2174/157488808786734006>
- Morgan, H. P., O'Reilly, F. J., Wear, M. A., O'Neill, J. R., Fothergill-Gilmore, L. A., Hupp, T., & Walkinshaw, M. D. (2013). M2 pyruvate kinase provides a mechanism for nutrient sensing and regulation of cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(15), 5881–5886. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217157110>
- Morowitz, H. J., Kostelnik, J. D., Yang, J., & Cody, G. D. (2000). The origin of intermediary metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(14), 7704–7708. <https://doi.org/10.1073/pnas.110153997>
- Morrison, S. J., & Weissman, I. L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, *1*(8), 661–673. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90037-X](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90037-X)
- Mostafa, S. S., Miller, W. M., & Papoutsakis, E. T. (2000). Oxygen tension influences the differentiation, maturation and apoptosis of human megakaryocytes. *British Journal of Haematology*, *111*(3), 879–889.
- Moyle, D. M. (1924). A Quantitative Study of Succinic Acid in Muscle. I. *The Biochemical Journal*, *18*(2), 351–364. <https://doi.org/10.1042/bj0180351>
- Mráček, T., Drahotka, Z., & Houštěk, J. (2013). The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1827*(3), 401–410. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.014>

- Mudd, S. H., Irreverre, F., & Laster, L. (1967). Sulfite Oxidase Deficiency in Man: Demonstration of the Enzymatic Defect. *Science*, 156(3782), 1599–1602. <https://doi.org/10.1126/science.156.3782.1599>
- Muench, M. O., Gasparetto, C., & Moore, M. A. S. (1992). The in vitro growth of murine high proliferative potential-colony forming cells is not enhanced by growth in a low oxygen atmosphere. *Cytokine*, 4(6), 488–494. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(92\)90009-G](https://doi.org/10.1016/1043-4666(92)90009-G)
- Müer, M. (1993). Review Article: The hydrogenosome. *Microbiology*, 139(12), 2879–2889. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-12-2879>
- Mullen, A. R., Wheaton, W. W., Jin, E. S., Chen, P.-H., Sullivan, L. B., Cheng, T., Yang, Y., Linehan, W. M., Chandel, N. S., & DeBerardinis, R. J. (2012). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature*, 481(7381), Article 7381. <https://doi.org/10.1038/nature10642>
- Müller, F. (1864). *Für Darwin*. Wilhelm Engelmann.
- Müller, M. (2003). Chapter 7 - Energy metabolism: Part I: Anaerobic protozoa. In J. J. Marr, T. W. Nilsen, & R. W. Komuniecki (Eds.), *Molecular Medical Parasitology* (pp. 125–139). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012473346-6/50008-9>
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B., Yu, R.-Y., van der Giezen, M., Tielens, A. G. M., & Martin, W. F. (2012). Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 444–495. <https://doi.org/10.1128/mubr.05024-11>
- Muraglia, A., Cancedda, R., & Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 7), 1161–1166.
- Murphy, E., & Steenbergen, C. (2008). Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiological Reviews*, 88(2), 581–609. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2007>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Mylotte, L. A., Duffy, A. M., Murphy, M., O'Brien, T., Samali, A., Barry, F., & Szegezdi, E. (2008). Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(5), 1325–1336. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1072>
- Najar, M., Crompton, E., van Grunsven, L. A., Dollé, L., & Lagneaux, L. (2018). Foreskin-derived mesenchymal stromal cells with aldehyde dehydrogenase activity: Isolation and gene profiling. *BMC Cell Biology*, 19(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12860-018-0157-0>
- Najar, M., Crompton, E., van Grunsven, L. A., Dollé, L., & Lagneaux, L. (2019). Aldehyde dehydrogenase activity of Wharton jelly mesenchymal stromal cells: Isolation and characterization. *Cytotechnology*, 71(1), 427–441. <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0283-8>
- Najar, M., Dollé, L., Crompton, E., Verhulst, S., van Grunsven, L. A., Busser, H., & Lagneaux, L. (2018). Isolation and Characterization of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell Subsets in Culture Based on Aldehyde Dehydrogenase Activity. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 24(2), 89–98. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2017.0312>
- Nakano, H., Murai, S., & Moriwaki, K. (2022). Regulation of the release of damage-associated molecular patterns from necroptotic cells. *Biochemical Journal*, 479(5), 677–685. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210604>
- Nakano, I., & Kornblum, H. I. (2006). Brain Tumor Stem Cells. *Pediatric Research*, 59(4), Article 4. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000203568.63482.f9>
- Needham, D. M. (1927). A Quantitative Study of Succinic Acid in Muscle. II: The Metabolic Relationships of Succinic, Malic and Fumaric Acids. *The Biochemical Journal*, 21(3), 739–750. <https://doi.org/10.1042/bj0210739>
- Neely, J. R., & Feuvray, D. (1981). Metabolic products and myocardial ischemia. *The American Journal of Pathology*, 102(2), 282–291.

- Neely, J. R., & Morgan, H. E. (1974). Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annual Review of Physiology*, 36, 413–459. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.36.030174.002213>
- Nishimoto, E., Yamada, Y., Miyake, H., Mitsuya, H., & Yonemura, Y. (2007). Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow Using Aldehyde Dehydrogenase as a Marker. *Blood*, 110(11), 1929. <https://doi.org/10.1182/blood.V110.11.1929.1929>
- Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K. J., Harley, B., Mahoney, J. E., Park, S.-Y., Lu, J., Protopopov, A., & Silberstein, L. E. (2013). Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nature Cell Biology*, 15(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/ncb2730>
- Nowell, P. C., Cole, L. J., Habermeyer, J. G., & Roan, P. L. (1956). Growth and continued function of rat marrow cells in x-radiated mice. *Cancer Research*, 16(3), 258–261.
- Nwaigwe, C. I., Roche, M. A., Grinberg, O., & Dunn, J. F. (2000). Effect of hyperventilation on brain tissue oxygenation and cerebrovenous PO₂ in rats. *Brain Research*, 868(1), 150–156. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02321-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02321-0)
- Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffman, M. A., Kim, T.-Y., Huang, L. E., Pavletich, N., Chau, V., & Kaelin, W. G. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel–Lindau protein. *Nature Cell Biology*, 2(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/35017054>
- Ohkawa, K.-I., Vogt, M. T., & Farber, E. (1969). UNUSUALLY HIGH MITOCHONDRIAL ALPHA GLYCEROPHOSPHATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN RAT BROWN ADIPOSE TISSUE. *Journal of Cell Biology*, 41(2), 441–449. <https://doi.org/10.1083/jcb.41.2.441>
- Olszewski, K. L., & Llinás, M. (2011). Central carbon metabolism of Plasmodium parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 175(2), 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.09.001>
- Oparin, A. I. (1957). The origin of life on the earth. *The Origin of Life on the Earth.*, 3rd Ed. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19581603563>
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., & Nakauchi, H. (1996). Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell. *Science*, 273(5272), 242–245. <https://doi.org/10.1126/science.273.5272.242>
- Owen, O. E., Kalhan, S. C., & Hanson, R. W. (2002). The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30409–30412. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200006200>
- Paget, T. A., & Lloyd, D. (1990). Trichomonas vaginalis requires traces of oxygen and high concentrations of carbon dioxide for optimal growth. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 41(1), 65–72. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90097-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90097-6)
- Painter, H. J., Morrissey, J. M., Mather, M. W., & Vaidya, A. B. (2007). Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage Plasmodium falciparum. *Nature*, 446(7131), Article 7131. <https://doi.org/10.1038/nature05572>
- Paltoglou, S., & Roberts, B. J. (2007). HIF-1 α and EPAS ubiquitination mediated by the VHL tumour suppressor involves flexibility in the ubiquitination mechanism, similar to other RING E3 ligases. *Oncogene*, 26(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209818>
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A., & Ruggiero, F. M. (2004). Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: Involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circulation Research*, 94(1), 53–59. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000109416.56608.64>
- Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.-A., Sackstein, R., & Down, J. D. (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13), 5431–5436. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701152104>

- Patel, B. H., Percivalle, C., Ritson, D. J., Duffy, C. D., & Sutherland, J. D. (2015). Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. *Nature Chemistry*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nchem.2202>
- Pattappa, G., Heywood, H. K., de Bruijn, J. D., & Lee, D. A. (2011). The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 226(10), 2562–2570. <https://doi.org/10.1002/jcp.22605>
- Pavlov, A. A., & Kasting, J. F. (2002). Mass-independent fractionation of sulfur isotopes in Archean sediments: Strong evidence for an anoxic Archean atmosphere. *Astrobiology*, 2(1), 27–41. <https://doi.org/10.1089/153110702753621321>
- Pennathur-Das, R., & Levitt, L. (1987). Augmentation of In Vitro Human Marrow Erythropoiesis Under Physiological Oxygen Tensions Is Mediated by Monocytes and T Lymphocytes. *Blood*, 69(3), 899–907. <https://doi.org/10.1182/blood.V69.3.899.899>
- Petrik, D., Jörgensen, S., Eftychidis, V., & Siebzehnruhl, F. A. (2022). Singular Adult Neural Stem Cells Do Not Exist. *Cells*, 11(4), 722. <https://doi.org/10.3390/cells11040722>
- Petrosillo, G., Ruggiero, F. M., & Paradies, G. (2003). Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *The FASEB Journal*, 17(15), 2202–2208. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0012com>
- Picton, R., Eggo, M. C., Merrill, G. A., Langman, M. J. S., & Singh, S. (2002). Mucosal protection against sulphide: Importance of the enzyme rhodanese. *Gut*, 50(2), 201–205. <https://doi.org/10.1136/gut.50.2.201>
- Pike Winer, L. S., & Wu, M. (2014). Rapid analysis of glycolytic and oxidative substrate flux of cancer cells in a microplate. *PloS One*, 9(10), e109916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109916>
- Plaxton, W. C. (1996). The Organization and Regulation of Plant Glycolysis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 185–214. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.185>
- Pollak, N., Niere, M., & Ziegler, M. (2007). NAD Kinase Levels Control the NADPH Concentration in Human Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33562–33571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704442200>
- Ponte, A. L., Marais, E., Gallay, N., Langonné, A., Delorme, B., Hérault, O., Charbord, P., & Domenech, J. (2007). The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: Comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(7), 1737–1745. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0054>
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W. A., & Van Dijken, J. P. (1989). Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(2), 468–477. <https://doi.org/10.1128/aem.55.2.468-477.1989>
- Poulton, S. W., Fralick, P. W., & Canfield, D. E. (2004). The transition to a sulphidic ocean approximately 1.84 billion years ago. *Nature*, 431(7005), 173–177. <https://doi.org/10.1038/nature02912>
- Powell, M. A., & Somero, G. N. (1986). Hydrogen Sulfide Oxidation Is Coupled to Oxidative Phosphorylation in Mitochondria of *Solemya reidi*. *Science (New York, N.Y.)*, 233(4763), 563–566. <https://doi.org/10.1126/science.233.4763.563>
- Prockop, D. J. (1997). Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. *Science*, 276(5309), 71–74. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.71>
- Pronk, J. T., Yde Steensma, H., & Van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12(16), 1607–1633. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199612\)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199612)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4)
- Ralser, M., Wamelink, M. M., Kowald, A., Gerisch, B., Heeren, G., Struys, E. A., Klipp, E., Jakobs, C., Breitenbach, M., Lehrach, H., & Krobitsch, S. (2007). Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of Biology*, 6(4), 10. <https://doi.org/10.1186/jbiol61>
- Ramos-Cabrer, P., Campos, F., Sobrino, T., & Castillo, J. (2011). Targeting the ischemic penumbra. *Stroke*, 42(1 Suppl), S7-11. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.596684>

- Randall, T., Lund, F., Howard, M., & Weissman, I. (1996). Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Blood*, *87*(10), 4057–4067. <https://doi.org/10.1182/blood.V87.10.4057.bloodjournal87104057>
- Rapoport, S. (1968). The regulation of glycolysis in mammalian erythrocytes. *Essays in Biochemistry*, *4*, 69–103.
- Reddy, A., Bozi, L. H. M., Yaghi, O. K., Mills, E. L., Xiao, H., Nicholson, H. E., Paschini, M., Paulo, J. A., Garrity, R., Laznik-Bogoslavski, D., Ferreira, J. C. B., Carl, C. S., Sjøberg, K. A., Wojtaszewski, J. F. P., Jeppesen, J. F., Kiens, B., Gygi, S. P., Richter, E. A., Mathis, D., & Chouchani, E. T. (2020). pH-Gated Succinate Secretion Regulates Muscle Remodeling in Response to Exercise. *Cell*, *183*(1), 62–75.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.039>
- Remacle, C., Barbieri, M. R., Cardol, P., & Hamel, P. P. (2008). Eukaryotic complex I: Functional diversity and experimental systems to unravel the assembly process. *Molecular Genetics and Genomics*, *280*(2), 93–110. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0350-5>
- Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (New York, N.Y.)*, *255*(5052), 1707–1710. <https://doi.org/10.1126/science.1553558>
- Rich, P. B., Douillet, C. D., Mahler, S. A., Husain, S. A., & Boucher, R. C. (2003). Adenosine Triphosphate Is Released during Injurious Mechanical Ventilation and Contributes to Lung Edema. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, *55*(2), 290. <https://doi.org/10.1097/01.TA.0000078882.11919.AF>
- Robergs, R. A., Ghiasvand, F., & Parker, D. (2004). Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *287*(3), R502–R516. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00114.2004>
- Roobrouck, V. D., Clavel, C., Jacobs, S. A., Ulloa-Montoya, F., Crippa, S., Sohni, A., Roberts, S. J., Luyten, F. P., Van Gool, S. W., Sampaolesi, M., Delforge, M., Luttun, A., & Verfaillie, C. M. (2011). Differentiation Potential of Human Postnatal Mesenchymal Stem Cells, Mesoangioblasts, and Multipotent Adult Progenitor Cells Reflected in Their Transcriptome and Partially Influenced by the Culture Conditions. *Stem Cells*, *29*(5), 871–882. <https://doi.org/10.1002/stem.633>
- Rosen, J. M., & Jordan, C. T. (2009). The Increasing Complexity of the Cancer Stem Cell Paradigm. *Science*, *324*(5935), 1670–1673. <https://doi.org/10.1126/science.1171837>
- Rossant, J., Bernelot-Moens, C., & Nagy, A. (1993). Genome manipulation in embryonic stem cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *339*(1288), 207–215. <https://doi.org/10.1098/rstb.1993.0018>
- Roy, S., Khanna, S., Wallace, W. A., Lappalainen, J., Rink, C., Cardounel, A. J., Zweier, J. L., & Sen, C. K. (2003). Characterization of perceived hyperoxia in isolated primary cardiac fibroblasts and in the reoxygenated heart. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(47), 47129–47135. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308703200>
- Russell, R. R., Li, J., Coven, D. L., Pypaert, M., Zechner, C., Palmeri, M., Giordano, F. J., Mu, J., Birnbaum, M. J., & Young, L. H. (2004). AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *The Journal of Clinical Investigation*, *114*(4), 495–503. <https://doi.org/10.1172/JCI19297>
- Rüster, B., Göttig, S., Ludwig, R. J., Bistrrian, R., Müller, S., Seifried, E., Gille, J., & Henschler, R. (2006). Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, *108*(12), 3938–3944. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-025098>
- S, H. J. B. (1929). The origin of life. *Rationalist Annual*, *148*, 3–10.
- Sackstein, R., Merzaban, J. S., Cain, D. W., Dagia, N. M., Spencer, J. A., Lin, C. P., & Wohlgenuth, R. (2008). Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nature Medicine*, *14*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nm1703>
- Sadek, H. A., Szweda, P. A., & Szweda, L. I. (2004). Modulation of Mitochondrial Complex I Activity by Reversible Ca²⁺ and NADH Mediated Superoxide Anion Dependent Inhibition. *Biochemistry*, *43*(26), 8494–8502. <https://doi.org/10.1021/bi049803f>

- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), 225-IN6. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
- Saint Martin, A., Castañeda Patlán, M. C., & Robles-Flores, M. (2017). The Role of Hypoxia-Inducible Factors in Cancer Resistance. *Journal of Cell Signaling*, 2. <https://doi.org/10.4172/2576-1471.1000154>
- Saltzman, D. J., Toth, A., Tsai, A. G., Intaglietta, M., & Johnson, P. C. (2003). Oxygen tension distribution in postcapillary venules in resting skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 285(5), H1980-1985. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00322.2002>
- Samartsev, V. N., Belosludtsev, K. N., Chezganova, S. A., & Zeldi, I. P. (2002). Effect of Ethanol on the Palmitate-Induced Uncoupling of Oxidative Phosphorylation in Liver Mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*, 67(11), 1240–1247. <https://doi.org/10.1023/A:1021397220815>
- Sanada, S., Komuro, I., & Kitakaze, M. (2011). Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: Preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 301(5), H1723-1741. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00553.2011>
- Sánchez-Baracaldo, P., & Cardona, T. (2020). On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria. *New Phytologist*, 225(4), 1440–1446. <https://doi.org/10.1111/nph.16249>
- Sandvig, I., Gadjanski, I., Vlaski-Lafarge, M., Buzanska, L., Loncaric, D., Sarnowska, A., Rodriguez, L., Sandvig, A., & Ivanovic, Z. (2017). Strategies to Enhance Implantation and Survival of Stem Cells After Their Injection in Ischemic Neural Tissue. *Stem Cells and Development*, 26(8), 554–565. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0268>
- Sandvig, I., Karstensen, K., Rokstad, A. M., Aachmann, F. L., Formo, K., Sandvig, A., Skjåk-Bræk, G., & Strand, B. L. (2015). RGD-peptide modified alginate by a chemoenzymatic strategy for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(3), 896–906. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35230>
- Schaefer, S., & Ramasamy, R. (1997). Glycogen utilization and ischemic injury in the isolated rat heart. *Cardiovascular Research*, 35(1), 90–98. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(97\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(97)00087-4)
- Schena, G. J., Murray, E. K., Hildebrand, A. N., Headrick, A. L., Yang, Y., Koch, K. A., Kubo, H., Eaton, D., Johnson, J., Berretta, R., Mohsin, S., Kishore, R., McKinsey, T. A., Elrod, J. W., & Houser, S. R. (2021). Cortical bone stem cell-derived exosomes' therapeutic effect on myocardial ischemia-reperfusion and cardiac remodeling. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 321(6), H1014–H1029. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00197.2021>
- Schleyer, M., Schmidt, B., & Neupert, W. (1982). Requirement of a Membrane Potential for the Posttranslational Transfer of Proteins into Mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, 125(1), 109–116. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06657.x>
- Schnarrenberger, C., & Martin, W. (2002). Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. A case study of endosymbiotic gene transfer. *European Journal of Biochemistry*, 269(3), 868–883. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02722.x>
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4(1–2), 7–25.
- Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T., & Korsmeyer, S. J. (2003). BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca²⁺: A Control Point for Apoptosis. *Science*, 300(5616), 135–139. <https://doi.org/10.1126/science.1081208>
- Segers, V. F. M., Van Riet, I., Andries, L. J., Lemmens, K., Demolder, M. J., De Becker, A. J. M. L., Kockx, M. M., & De Keulenaer, G. W. (2006). Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: Activators and mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 290(4), H1370–H1377. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00523.2005>
- Semenza, G. L., & Wang, G. L. (1992). A Nuclear Factor Induced by Hypoxia via De Novo Protein Synthesis Binds to the Human Erythropoietin Gene Enhancer at a Site Required for Transcriptional Activation. *Molecular and Cellular Biology*, 12(12), 5447–5454. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.12.5447-5454.1992>

- Sensebé, L., & Bourin, P. (2009). Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Purposes. *Transplantation*, 87(9S), S49. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181a28635>
- Sharma, V., Belevich, G., Gamiz-Hernandez, A. P., Róg, T., Vattulainen, I., Verkhovskaya, M. L., Wikström, M., Hummer, G., & Kaila, V. R. I. (2015). Redox-induced activation of the proton pump in the respiratory complex I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(37), 11571–11576. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503761112>
- Shen, Y., Knoll, A. H., & Walter, M. R. (2003). Evidence for low sulphate and anoxia in a mid-Proterozoic marine basin. *Nature*, 423(6940), 632–635. <https://doi.org/10.1038/nature01651>
- Shyh-Chang, N., Zheng, Y., Locasale, J. W., & Cantley, L. C. (2011). Human pluripotent stem cells decouple respiration from energy production. *The EMBO Journal*, 30(24), 4851–4852. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.436>
- Siesjö, B. K. (1978). Brain energy metabolism and catecholaminergic activity in hypoxia, hypercapnia and ischemia. *Journal of Neural Transmission Supplementum*, 14, 17–22.
- Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R. J., Mahmoud, A. I., Olson, E. N., Schneider, J. W., Zhang, C. C., & Sadek, H. A. (2010). The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*, 7(3), 380–390. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.011>
- Singh, R. P., Franke, K., Kalucka, J., Mamlouk, S., Muschter, A., Gembarska, A., Grinenko, T., Willam, C., Naumann, R., Anastasiadis, K., Stewart, A. F., Bornstein, S., Chavakis, T., Breier, G., Waskow, C., & Wielockx, B. (2013). HIF prolyl hydroxylase 2 (PHD2) is a critical regulator of hematopoietic stem cell maintenance during steady-state and stress. *Blood*, 121(26), 5158–5166. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-471185>
- Singh, S., & Banerjee, R. (2011). PLP-dependent H(2)S biogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1814(11), 1518–1527. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.02.004>
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Research*, 63(18), 5821–5828.
- Slegtenhorst, B. R., Dor, F. J. M. F., Rodriguez, H., Voskuil, F. J., & Tullius, S. G. (2014). Ischemia/Reperfusion Injury and its Consequences on Immunity and Inflammation. *Current Transplantation Reports*, 1(3), 147–154. <https://doi.org/10.1007/s40472-014-0017-6>
- Sluijter, J. P. G., Verhage, V., Deddens, J. C., van den Akker, F., & Doevendans, P. A. (2014). Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. *Cardiovascular Research*, 102(2), 302–311. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu022>
- Smith, E. J., Stroemer, R. P., Gorenkova, N., Nakajima, M., Crum, W. R., Tang, E., Stevanato, L., Sinden, J. D., & Mado, M. (2012). Implantation site and lesion topology determine efficacy of a human neural stem cell line in a rat model of chronic stroke. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 30(4), 785–796. <https://doi.org/10.1002/stem.1024>
- Solomonson, A., & DeBerardinis, R. J. (2018). Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 293(20), 7522–7530. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000259>
- Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: Evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, 107(4), 1484–1490. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2775>
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S., & Weissman, I. L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 241(4861), 58–62. <https://doi.org/10.1126/science.2898810>
- Spencer, J. A., Ferraro, F., Roussakis, E., Klein, A., Wu, J., Runnels, J. M., Zaher, W., Mortensen, L. J., Alt, C., Turcotte, R., Yusuf, R., Côté, D., Vinogradov, S. A., Scadden, D. T., & Lin, C. P. (2014). Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*, 508(7495), Article 7495. <https://doi.org/10.1038/nature13034>

- Sperling, E. A., Frieder, C. A., Raman, A. V., Girguis, P. R., Levin, L. A., & Knoll, A. H. (2013). Oxygen, ecology, and the Cambrian radiation of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(33), 13446–13451. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312778110>
- Spinelli, J. B., Rosen, P. C., Sprenger, H.-G., Puszynska, A. M., Mann, J. L., Roessler, J. M., Cangelosi, A. L., Henne, A., Condon, K. J., Zhang, T., Kunchok, T., Lewis, C. A., Chandel, N. S., & Sabatini, D. M. (2021). Fumarate is a terminal electron acceptor in the mammalian electron transport chain. *Science*, *374*(6572), 1227–1237. <https://doi.org/10.1126/science.abi7495>
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., & Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature*, *414*(6859), 98–104. <https://doi.org/10.1038/35102160>
- Stamati, K., Mudera, V., & Cheema, U. (2011). Evolution of oxygen utilization in multicellular organisms and implications for cell signalling in tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*, *2*(1), 2041731411432365. <https://doi.org/10.1177/2041731411432365>
- Steenbergen, C., Murphy, E., Levy, L., & London, R. E. (1987). Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circulation Research*, *60*(5), 700–707. <https://doi.org/10.1161/01.RES.60.5.700>
- Steinbüchel, A., & Müller, M. (1986). Glycerol, a metabolic end product of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *20*(1), 45–55. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90141-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(86)90141-6)
- Steingen, C., Brenig, F., Baumgartner, L., Schmidt, J., Schmidt, A., & Bloch, W. (2008). Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *44*(6), 1072–1084. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.03.010>
- Stobbe, M. D., Houten, S. M., van Kampen, A. H. C., Wanders, R. J. A., & Moerland, P. D. (2012). Improving the description of metabolic networks: The TCA cycle as example. *The FASEB Journal*, *26*(9), 3625–3636. <https://doi.org/10.1096/fj.11-203091>
- Stroud, D. A., Surgenor, E. E., Formosa, L. E., Reljic, B., Frazier, A. E., Dibley, M. G., Osellame, L. D., Stait, T., Beilharz, T. H., Thorburn, D. R., Salim, A., & Ryan, M. T. (2016). Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature*, *538*(7623), Article 7623. <https://doi.org/10.1038/nature19754>
- Stumvoll, M., Perriello, G., Meyer, C., & Gerich, J. (1999). Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. *Kidney International*, *55*(3), 778–792. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.055003778.x>
- Suda, T., Takubo, K., & Semenza, G. L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell*, *9*(4), 298–310. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.09.010>
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., & Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, *25*(6), 977–988. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.016>
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., & Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, *121*(7), 1043–1057. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.025>
- Sutak, R., Dolezal, P., Fiumera, H. L., Hrdy, I., Dancis, A., Delgadillo-Correa, M., Johnson, P. J., Müller, M., & Tachezy, J. (2004). Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(28), 10368–10373. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401319101>
- Takahashi, E., & Sato, M. (2014). Anaerobic respiration sustains mitochondrial membrane potential in a prolyl hydroxylase pathway-activated cancer cell line in a hypoxic microenvironment. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *306*(4), C334–C342. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00255.2013>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, *131*(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>

- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R. S., Hirao, A., Suematsu, M., & Suda, T. (2010). Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 7(3), 391–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.020>
- Tashiro, T., Ishida, A., Hori, M., Igisu, M., Koike, M., Méjean, P., Takahata, N., Sano, Y., & Komiya, T. (2017). Early trace of life from 3.95 Ga sedimentary rocks in Labrador, Canada. *Nature*, 549(7673), 516–518. <https://doi.org/10.1038/nature24019>
- Tasso, R., Gaetani, M., Molino, E., Cattaneo, A., Monticone, M., Bachi, A., & Cancedda, R. (2012). The role of bFGF on the ability of MSC to activate endogenous regenerative mechanisms in an ectopic bone formation model. *Biomaterials*, 33(7), 2086–2096. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.043>
- Tello, D., Balsa, E., Acosta-Iborra, B., Fuertes-Yebra, E., Elorza, A., Ordóñez, Á., Corral-Escariz, M., Soro, I., López-Bernardo, E., Perales-Clemente, E., Martínez-Ruiz, A., Enríquez, J. A., Aragonés, J., Cadenas, S., & Landázuri, M. O. (2011). Induction of the Mitochondrial NDUFA4L2 Protein by HIF-1 α Decreases Oxygen Consumption by Inhibiting Complex I Activity. *Cell Metabolism*, 14(6), 768–779. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.10.008>
- Teringova, E., & Tousek, P. (2017). Apoptosis in ischemic heart disease. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1191-y>
- Thapa, M., & Dallmann, G. (2020). Role of coenzymes in cancer metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 98, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.027>
- Theissen, U., Hoffmeister, M., Grieshaber, M., & Martin, W. (2003). Single Eubacterial Origin of Eukaryotic Sulfide:Quinone Oxidoreductase, a Mitochondrial Enzyme Conserved from the Early Evolution of Eukaryotes During Anoxic and Sulfidic Times. *Molecular Biology and Evolution*, 20(9), 1564–1574. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg174>
- Theissen, U., & Martin, W. (2008). Sulfide: Quinone oxidoreductase (SQR) from the lugworm *Arenicola marina* shows cyanide- and thioredoxin-dependent activity. *The FEBS Journal*, 275(6), 1131–1139. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06273.x>
- Thorens, B., & Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 298(2), E141-145. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00712.2009>
- Tielens, A. G. M., Rotte, C., van Hellemond, J. J., & Martin, W. (2002). Mitochondria as we don't know them. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(11), 564–572. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02193-x](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02193-x)
- Till, J. E., & McCulloch, E. A. (1961). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research*, 14(2), 213–222. <https://doi.org/10.2307/3570892>
- Timmis, J. N., Ayliffe, M. A., Huang, C. Y., & Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews. Genetics*, 5(2), 123–135. <https://doi.org/10.1038/nrg1271>
- Tiranti, V., D'Adamo, P., Briem, E., Ferrari, G., Mineri, R., Lamantea, E., Mandel, H., Balestri, P., Garcia-Silva, M.-T., Vollmer, B., Rinaldo, P., Hahn, S. H., Leonard, J., Rahman, S., Dionisi-Vici, C., Garavaglia, B., Gasparini, P., & Zeviani, M. (2004). Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in ETHE1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein. *American Journal of Human Genetics*, 74(2), 239–252. <https://doi.org/10.1086/381653>
- Tiranti, V., Viscomi, C., Hildebrandt, T., Di Meo, I., Mineri, R., Tiveron, C., D Levitt, M., Prella, A., Fagiolari, G., Rimoldi, M., & Zeviani, M. (2009). Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nature Medicine*, 15(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nm.1907>
- Tjaden, J., Haferkamp, I., Boxma, B., Tielens, A. G. M., Huynen, M., & Hackstein, J. H. P. (2004). A divergent ADP/ATP carrier in the hydrogenosomes of *Trichomonas gallinae* argues for an

- independent origin of these organelles. *Molecular Microbiology*, 51(5), 1439–1446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.03918.x>
- Tomitsuka, E., Kita, K., & Esumi, H. (2010). The NADH-fumarate reductase system, a novel mitochondrial energy metabolism, is a new target for anticancer therapy in tumor microenvironments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201, 44–49. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05620.x>
- Tomitsuka, E., Kita, K., & Esumi, H. (2012). An anticancer agent, pyruvium pamoate inhibits the NADH-fumarate reductase system—A unique mitochondrial energy metabolism in tumour microenvironments. *Journal of Biochemistry*, 152(2), 171–183. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs041>
- Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M., & Lucocq, J. M. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*, 426(6963), Article 6963. <https://doi.org/10.1038/nature01945>
- Tran, D., Boudou, A., & Massabuau, J.-C. (2000). Mechanism for maintaining oxygen consumption under varying oxygenation levels in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Canadian Journal of Zoology*, 78(11), 2027–2036. <https://doi.org/10.1139/z00-139>
- Trumpp, A., Essers, M., & Wilson, A. (2010). Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nri2726>
- Valadi, Å., Granath, K., Gustafsson, L., & Adler, L. (2004). Distinct Intracellular Localization of Gpd1p and Gpd2p, the Two Yeast Isoforms of NAD⁺-dependent Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase, Explains Their Different Contributions to Redox-driven Glycerol Production *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39677–39685. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403310200>
- Valorani, M. G., Germani, A., Otto, W. R., Harper, L., Biddle, A., Khoo, C. P., Lin, W. R., Hawa, M. I., Tropel, P., Patrizi, M. P., Pozzilli, P., & Alison, M. R. (2010). Hypoxia increases Sca-1/CD44 co-expression in murine mesenchymal stem cells and enhances their adipogenic differentiation potential. *Cell and Tissue Research*, 341(1), 111–120. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-0982-8>
- Van den Thillart, G., Van Berge-Henegouwen, M., & Kesbeke, F. (1983). Anaerobic metabolism of goldfish, *Carassius auratus* (L.): Ethanol and CO₂ excretion rates and anoxia tolerance at 20, 10 and 5°C. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 76(2), 295–300. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(83\)90330-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(83)90330-4)
- van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 1(3–4), 199–224. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01194.x>
- Van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W. A., & Van Dijken, J. P. (1989). Glucose Transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative Yeasts. *Microbiology*, 135(9), 2399–2406. <https://doi.org/10.1099/00221287-135-9-2399>
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: An ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrm2970>
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Vanderkooi, J. M., Erecinska, M., & Silver, I. A. (1991). Oxygen in mammalian tissue: Methods of measurement and affinities of various reactions. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 260(6), C1131–C1150. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1991.260.6.C1131>
- Veitch, K., Hombroeckx, A., Caucheteux, D., Pouleur, H., & Hue, L. (1992). Global ischaemia induces a biphasic response of the mitochondrial respiratory chain. Anoxic pre-perfusion protects against ischaemic damage. *Biochemical Journal*, 281(3), 709–715. <https://doi.org/10.1042/bj2810709>

- Ventura, F. V., Ruiten, J. P. N., IJlst, L., Almeida, I. T., & Wanders, R. J. A. (1995). Inhibition of oxidative phosphorylation by palmitoyl-CoA in digitonin permeabilized fibroblasts: Implications for long-chain fatty acid β -oxidation disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1272*(1), 14–20. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(95\)00064-B](https://doi.org/10.1016/0925-4439(95)00064-B)
- Verhagen, A. van W., G. van den Thillart, M. (1993). Ethanol Formation and pH-Regulation in Fish. In *Surviving Hypoxia*. CRC Press.
- Vignon, C., Lachot, S., Foucault, A., Ravalet, N., Gyan, E., Picou, F., Herault, B., Le Nail, L.-R., Bene, M. C., & Herault, O. (2020). Reactive oxygen species levels differentiate CD34+ human progenitors based on CD38 expression. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, *98*(6), 516–521. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21948>
- Vlaski-Lafarge, M., Labat, V., Brandy, A., Refeyton, A., Duchez, P., Rodriguez, L., Gibson, N., Brunet de la Grange, P., & Ivanovic, Z. (2020). Normal Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Can Exhibit Metabolic Flexibility Similar to Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, *10*, 713. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00713>
- Vlaski-Lafarge, M., Loncaric, D., Perez, L., Labat, V., Debeissat, C., Brunet de la Grange, P., Rossignol, R., Ivanovic, Z., & Bœuf, H. (2019). Bioenergetic Changes Underline Plasticity of Murine Embryonic Stem Cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *37*(4), 463–475. <https://doi.org/10.1002/stem.2965>
- Völkel, S., & Grieshaber, M. K. (1997). Sulphide Oxidation and Oxidative Phosphorylation in the Mitochondria of the Lugworm *Arenicola Marina*. *Journal of Experimental Biology*, *200*(1), 83–92. <https://doi.org/10.1242/jeb.200.1.83>
- von Ballmoos, C., Wiedenmann, A., & Dimroth, P. (2009). Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annual Review of Biochemistry*, *78*, 649–672. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.104803>
- Wagner, W., Wein, F., Roderburg, C., Saffrich, R., Faber, A., Krause, U., Schubert, M., Benes, V., Eckstein, V., Maul, H., & Ho, A. D. (2007). Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell–cell interaction. *Experimental Hematology*, *35*(2), 314–325. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.10.003>
- Walse, B., Dufe, V. T., Svensson, B., Fritzson, I., Dahlberg, L., Khairoullina, A., Wellmar, U., & Al-Karadaghi, S. (2008). The Structures of Human Dihydroorotate Dehydrogenase with and without Inhibitor Reveal Conformational Flexibility in the Inhibitor and Substrate Binding Sites. *Biochemistry*, *47*(34), 8929–8936. <https://doi.org/10.1021/bi8003318>
- Wang, T. J., Larson, M. G., Vasani, R. S., Cheng, S., Rhee, E. P., McCabe, E., Lewis, G. D., Fox, C. S., Jacques, P. F., Fernandez, C., O'Donnell, C. J., Carr, S. A., Mootha, V. K., Florez, J. C., Souza, A., Melander, O., Clish, C. B., & Gerszten, R. E. (2011). Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nature Medicine*, *17*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nm.2307>
- Wang, Y.-P., Zhou, L.-S., Zhao, Y.-Z., Wang, S.-W., Chen, L.-L., Liu, L.-X., Ling, Z.-Q., Hu, F.-J., Sun, Y.-P., Zhang, J.-Y., Yang, C., Yang, Y., Xiong, Y., Guan, K.-L., & Ye, D. (2014). Regulation of G6PD acetylation by SIRT2 and KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress. *The EMBO Journal*, *33*(12), 1304–1320. <https://doi.org/10.1002/embj.201387224>
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*, *123*(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Watmough, N. J., & Frerman, F. E. (2010). The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1797*(12), 1910–1916. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.007>
- Weidemann, A., & Johnson, R. S. (2008). Biology of HIF-1 α . *Cell Death & Differentiation*, *15*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.12>
- Weijts, B., Yvernogeu, L., & Robin, C. (2021). Recent Advances in Developmental Hematopoiesis: Diving Deeper With New Technologies. *Frontiers in Immunology*, *12*, 790379. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.790379>

- Weil-Malherbe, H. (1936). Studies on brain metabolism: The metabolism of glutamic acid in brain. *The Biochemical Journal*, 30(4), 665–676. <https://doi.org/10.1042/bj0300665>
- Weissman, I. L., & Shizuru, J. A. (2008). The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*, 112(9), 3543–3553. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-078220>
- Welch, W. J., Baumgärtl, H., Lübbers, D., & Wilcox, C. S. (2001). Nephron pO₂ and renal oxygen usage in the hypertensive rat kidney. *Kidney International*, 59(1), 230–237. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00483.x>
- Westley, J., Adler, H., Westley, L., & Nishida, C. (1983). The sulfurtransferases. *Fundamental and Applied Toxicology*, 3(5), 377–382. [https://doi.org/10.1016/S0272-0590\(83\)80008-6](https://doi.org/10.1016/S0272-0590(83)80008-6)
- Whalen, W. J., Ganfield, R., & Nair, P. (1970). Effects of breathing O₂ or O₂ + CO₂ and of the injection of neurohumors on the PO₂ of cat cerebral cortex. *Stroke*, 1(3), 194–200. <https://doi.org/10.1161/01.str.1.3.194>
- Wierenga, A. T. J., Vellenga, E., & Schuringa, J. J. (2014). Convergence of Hypoxia and TGFβ Pathways on Cell Cycle Regulation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *PLOS ONE*, 9(3), e93494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093494>
- Wild, J. M., Fischele, S., Woodhouse, N., Paley, M. N. J., Kasuboski, L., & van Beek, E. J. R. (2005). 3D volume-localized pO₂ measurement in the human lung with ³He MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, 53(5), 1055–1064. <https://doi.org/10.1002/mrm.20423>
- WILKINS, B. S., & Jones, D. B. (1995). Immunohistochemical characterization of intact stromal layers in long-term cultures of human bone marrow. *British Journal of Haematology*, 90(4), 757–766. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1995.tb05193.x>
- Wilson, A., Murphy, M. J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M. D., Oser, G. M., Pasche, A.-C., Knabenhans, C., MacDonald, H. R., & Trumpp, A. (2004). C-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & Development*, 18(22), 2747–2763. <https://doi.org/10.1101/gad.313104>
- Wilson, A., & Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology*, 6(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nri1779>
- Wilson, J. E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: Structure, subcellular localization and metabolic function. *The Journal of Experimental Biology*, 206(Pt 12), 2049–2057. <https://doi.org/10.1242/jeb.00241>
- Wilson, K., Mudra, M., Furne, J., & Levitt, M. (2008). Differentiation of the Roles of Sulfide Oxidase and Rhodanese in the Detoxification of Sulfide by the Colonic Mucosa. *Digestive Diseases and Sciences*, 53(1), 277–283. <https://doi.org/10.1007/s10620-007-9854-9>
- Winkler, I. G., Barbier, V., Wadley, R., Zannettino, A. C. W., Williams, S., & Lévesque, J.-P. (2010). Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: Serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches. *Blood*, 116(3), 375–385. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-233437>
- Wölfle, D., & Jungermann, K. (1985). Long-term effects of physiological oxygen concentrations on glycolysis and gluconeogenesis in hepatocyte cultures. *European Journal of Biochemistry*, 151(2), 299–303. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09100.x>
- Wu, C., Khan, S. A., & Lange, A. J. (2005). Regulation of glycolysis—Role of insulin. *Experimental Gerontology*, 40(11), 894–899. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.08.002>
- Wu, M., Neilson, A., Swift, A. L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S., Lemire, K., Orrell, J., Teich, J., Chomicz, S., & Ferrick, D. A. (2007). Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 292(1), C125–136. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00247.2006>
- Wynn, R. F., Hart, C. A., Corradi-Perini, C., O'Neill, L., Evans, C. A., Wraith, J. E., Fairbairn, L. J., & Bellantuono, I. (2004). A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses

- functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, *104*(9), 2643–2645. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0526>
- Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., & Deisenhofer, J. (1997). Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science (New York, N.Y.)*, *277*(5322), 60–66. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.60>
- Xiao, C., Wang, K., Xu, Y., Hu, H., Zhang, N., Wang, Y., Zhong, Z., Zhao, J., Li, Q., Zhu, D., Ke, C., Zhong, S., Wu, X., Yu, H., Zhu, W., Chen, J., Zhang, J., Wang, J., & Hu, X. (2018). Transplanted Mesenchymal Stem Cells Reduce Autophagic Flux in Infarcted Hearts via the Exosomal Transfer of miR-125b. *Circulation Research*, *123*(5), 564–578. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312758>
- Xiao, W., & Loscalzo, J. (2020). Metabolic Responses to Reductive Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, *32*(18), 1330–1347. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7803>
- Yahmi, N., Arkoun, B., Raslova, H., & Vainchenker, W. (2022). Différenciation mégacaryocytaire. Aspects cellulaires et régulation cytokinique. *Hématologie*, *28*(3), 192–219. <https://doi.org/10.1684/hma.2022.1756>
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T.-I., Jones, D. P., & Wang, X. (1997). Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science*, *275*(5303), 1129–1132. <https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1129>
- Yeo, R. W. Y., Lai, R. C., Zhang, B., Tan, S. S., Yin, Y., Teh, B. J., & Lim, S. K. (2013). Mesenchymal stem cell: An efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *65*(3), 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.001>
- Ying, W. (2008). NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: Regulation and biological consequences. *Antioxidants & Redox Signaling*, *10*(2), 179–206. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1672>
- Yoo, H. C., Yu, Y. C., Sung, Y., & Han, J. M. (2020). Glutamine reliance in cell metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*, *52*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00504-8>
- Yu, M., & Cantor, A. B. (2012). Megakaryopoiesis and Thrombopoiesis: An Update on Cytokines and Lineage Surface Markers. In J. M. Gibbins & M. P. Mahaut-Smith (Eds.), *Platelets and Megakaryocytes: Volume 3, Additional Protocols and Perspectives* (pp. 291–303). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-307-3_20
- Yu, W.-M., Liu, X., Shen, J., Jovanovic, O., Pohl, E. E., Gerson, S. L., Finkel, T., Broxmeyer, H. E., & Qu, C.-K. (2013). Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*, *12*(1), 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.022>
- Yue, Y., Wang, C., Benedict, C., Huang, G., Truongcao, M., Roy, R., Cimini, M., Garikipati, V. N. S., Cheng, Z., Koch, W. J., & Kishore, R. (2020). Interleukin-10 Deficiency Alters Endothelial Progenitor Cell-Derived Exosome Reparative Effect on Myocardial Repair via Integrin-Linked Kinase Enrichment. *Circulation Research*, *126*(3), 315–329. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315829>
- Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R., & Lazebnik, Y. (2007). Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *Journal of Cell Biology*, *178*(1), 93–105. <https://doi.org/10.1083/jcb.200703099>
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S. A., Petit, P. X., Mignotte, B., & Kroemer, G. (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *Journal of Experimental Medicine*, *182*(2), 367–377. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.367>
- Zancan, P., Almeida, F. V. R., Faber-Barata, J., Dellias, J. M., & Sola-Penna, M. (2007). Fructose-2,6-bisphosphate counteracts guanidinium chloride-, thermal-, and ATP-induced dissociation of skeletal muscle key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase: A structural mechanism for PFK allosteric regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *467*(2), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.08.032>

- Zatz, M., & Starling, A. (2005). Calpains and Disease. *New England Journal of Medicine*, 352(23), 2413–2423. <https://doi.org/10.1056/NEJMra043361>
- Zhang, J., Frerman, F. E., & Kim, J.-J. P. (2006). Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), 16212–16217. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604567103>
- Zhang, J., Wang, Y. T., Miller, J. H., Day, M. M., Munger, J. C., & Brookes, P. S. (2018). Accumulation of Succinate in Cardiac Ischemia Primarily Occurs via Canonical Krebs Cycle Activity. *Cell Reports*, 23(9), 2617–2628. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.104>
- Zhang, W., Ge, W., Li, C., You, S., Liao, L., Han, Q., Deng, W., & Zhao, R. C. H. (2004). Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells and Development*, 13(3), 263–271. <https://doi.org/10.1089/154732804323099190>
- Zhao, J. L., & Baltimore, D. (2015). Regulation of Stress-Induced Hematopoiesis. *Current Opinion in Hematology*, 22(4), 286–292. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000149>
- Zhao, J., Li, X., Hu, J., Chen, F., Qiao, S., Sun, X., Gao, L., Xie, J., & Xu, B. (2019). Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization. *Cardiovascular Research*, 115(7), 1205–1216. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz040>
- Zhu, X., & Zuo, L. (2013). Characterization of oxygen radical formation mechanism at early cardiac ischemia. *Cell Death & Disease*, 4(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.313>
- Zhu, Y., Feng, X., Abbott, J., Fang, X., Hao, Q., Monsel, A., Qu, J., Matthay, M. A., & Lee, J. W. (2014). Human Mesenchymal Stem Cell Microvesicles for Treatment of Escherichia coli Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Stem Cells*, 32(1), 116–125. <https://doi.org/10.1002/stem.1504>
- Zickermann, V., Wirth, C., Nasiri, H., Siegmund, K., Schwalbe, H., Hunte, C., & Brandt, U. (2015). Structural biology. Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6217), 44–49. <https://doi.org/10.1126/science.1259859>
- Zipori, D. (2004). The nature of stem cells: State rather than entity. *Nature Reviews Genetics*, 5(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nrg1475>
- Zu, X. L., & Guppy, M. (2004). Cancer metabolism: Facts, fantasy, and fiction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(3), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.136>
- Zuurbier, C. J., Bertrand, L., Beauloye, C. R., Andreadou, I., Ruiz-Meana, M., Jespersen, N. R., Kula-Alwar, D., Prag, H. A., Eric Botker, H., Dambrova, M., Montessuit, C., Kaambre, T., Liepinsh, E., Brookes, P. S., & Krieg, T. (2020). Cardiac metabolism as a driver and therapeutic target of myocardial infarction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(11), 5937–5954. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15180>



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

CYTOTHERAPY

journal homepage: www.isct-cytotherapy.org
 International Society
ISCT
 Cell & Gene Therapy®

Full-length article

Functional single-cell analyses of mesenchymal stromal cell proliferation and differentiation using ALDH-activity and mitochondrial ROS content

 Alice Refeyton^{1,2,3}, Véronique Labat^{1,2,3}, Margaux Mombled^{1,4,5}, Marija Vlaski-Lafarge^{1,2,3}, Zoran Ivanovic^{1,2,3,*}
¹ Etablissement Français du Sang Nouvelle Aquitaine, Bordeaux, France² Université de Bordeaux, Bordeaux, France³ Inserm Bordeaux U1211, Bordeaux, France⁴ Genethon, Évry-Courcouronne, France⁵ Inserm, Évry-Courcouronne, France

ARTICLE INFO

Article History:

Received 27 September 2023

Accepted 7 April 2024

Available online xxx

Key Words:

 aldehyde dehydrogenase
 mesenchymal stem cells
 multi-potency
 oxygen concentration
 ROS content
 single cell analysis

ABSTRACT

Background: Previous research has unveiled a stem cell-like transcriptome enrichment in the aldehyde dehydrogenase-expressing (ALDH^{high}) mesenchymal stromal cell (MStroC) fraction. However, considering the heterogeneity of MStroCs, with only a fraction of them presenting bona fide stem cells (MSCs), the actual potency of ALDH as an MSC-specific selection marker remains an issue.

Methods: To address this, the proliferative and differentiation potential of individual ALDH^{high} and ALDH^{low} MStroCs incubated at low oxygen concentrations, estimated to mimic stem cell niches (0.1% O₂), were assayed using single-cell clonal analysis, compared to standard conditions (20% O₂).

Results: We confirm that a high proliferative capacity and multi-potent MSCs are enriched in the ALDH^{high} MStroC population, especially when cells are cultured at 0.1% O₂. Measurements of reduced/oxidized glutathione and mitochondrial superoxide anions with MitoSoX (MSX) indicate that this advantage induced by low oxygen is related to a decrease in the oxidative and reactive oxygen species (ROS) levels in the stem cell metabolic setup. However, ALDH expression is neither specific nor exclusive to MSCs, as high proliferative capacity and multi-potent cells were also found in the ALDH^{low} fraction. Furthermore, single-cell assays performed after combined cell sorting based on ALDH and MSX showed that the MSX^{low} MStroC population is enriched in stem/progenitor cells in all conditions, irrespective of ALDH expression or culture oxygen concentration. Importantly, the ALDH^{high}MSX^{low} MStroC fraction exposed to 0.1% O₂ was almost exclusively composed of genuine MSCs. In contrast, neither progenitors nor stem cells (with a complete absence of colony-forming ability) were detected in the MSX^{high} fraction, which exclusively resides in the ALDH^{low} MStroC population.

Conclusion: Our study reveals that ALDH expression is not exclusively associated with MSCs. However, cell sorting using combined ALDH expression and ROS content can be utilized to exclude MStroCs lacking stem/progenitor cell properties.

© 2024 International Society for Cell & Gene Therapy. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Mesenchymal stromal cells (MStroCs) are spindle-shaped, plastic-adherent cells that exhibit paracrine functions (isolated from bone marrow, adipose and other tissue sources), containing a fraction of stem/progenitor cells (MSC) with self-renewal and multi-potent properties [1–6]. This MSC fraction decreases with each ex vivo passage [7]. Since the heterogeneous MStroC population exhibits therapeutic effects (immunomodulation, stimulation of regeneration) via

an extensive secretory capacity of these cells related to both biologically active molecules and exosomes [8], real MSC might be of interest in terms of direct regeneration. The enrichment of real MSC might change the paradigm of regenerative therapy, which currently mainly focuses on their secretory (paracrine) activity [9]. This enrichment might also clarify the confusion concerning MStroC populations endowed with a predominant secretory activity, which has been attributed to the stem cells [10].

Aldehydes are generated in human and animal metabolism from various endogenous or exogenous precursors, exhibiting effects ranging from homeostatic to cytotoxic and genotoxic [10]. The dominant pathway of their metabolism is oxidation to carboxylic acids by the enzymes aldehyde dehydrogenases (ALDH). This oxidation is generally considered a detoxification process. However, this is not entirely

Abbreviations: 2-DG, 2-deoxyglucose; ECAR, extracellular acidification rate; MSX, MitoSoX; OCR, oxygen consumption rate; ROS, reactive oxygen species.

* Correspondence: Zoran Ivanovic, MD, DSc, HDR, Etablissement Français du Sang Nouvelle Aquitaine, PI Amélie Raba Léon, CS22010, 33075 Bordeaux Cedex, France.

E-mail address: zoran.ivanovic@efs.sante.fr (Z. Ivanovic).

<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2024.04.003>

1465-3249/© 2024 International Society for Cell & Gene Therapy. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

accurate: the product of this reaction can be trichloroacetic acid, which is potentially toxic, but can also generate physiologically relevant molecules such as retinoic acid, implicated in cell differentiation, and gamma-aminobutyric acid, an important neurotransmitter [11,12]. The expression of ALDH is considered a hallmark, i.e., a universal marker for the identification of normal and malignant stem cells from multiple sources [13,14]. Thus, ALDH is acknowledged as important for multiple biological activities, including drug resistance, cell differentiation and oxidative stress response [15]. It is also considered a stem cell marker for the MStroC population derived from virtually all sources, such as bone marrow [16,17], adipose tissue [18], Wharton jelly [19], foreskin [20], etc.

The population of MStroC can be separated into two subpopulations with respect to ALDH expression: ALDH^{low} and ALDH^{high}. It has been published that each of these two populations of MStroC exhibits a distinct pattern of gene expression related to some properties of stemness (proliferation, response to hypoxia, phenotype, multi-lineage potential, etc.) [17]. Thus, the BM ALDH^{high} MStroC subset exhibits high angiogenic and secretory properties compared to the more differentiated ALDH^{low} fraction [21]. A recent study of functional characterization based on proliferation and multi-lineage differentiation *in vitro* elucidated that the ALDH^{high} adventitial perivascular cell population contains cells with mesenchymal stem cell potential. Single-cell sorting revealed that only 30% of these cells are capable of forming colony-forming unit-fibroblasts (CFU-F) colonies, representing the CFU-F progenitors. This shows that even when sorted, ALDH^{high} cells are highly heterogeneous [22].

Thus, functional analysis at the single-cell level of the MStroC population is the only way to draw relevant conclusions regarding either stem cells (multi-potent, high proliferative capacity cells) or committed progenitors (mid proliferative capacity cells limited to one- or two-lineage differentiation) [4,6,23].

The appropriate levels of reactive oxygen species (ROS) have recently been recognized as an important second messenger [24] and even suggested as important for MSC maintenance. On the contrary, a high level of ROS has been demonstrated to impair proliferation and differentiation [25]. With that respect, ROS plays a role in cell death and aging [26].

In this study, we analyzed single-cell clones from the human BM MStroC population sorted regarding ALDH and ROS expression. Both parameters were analyzed in cell cultures under 0.1% O₂, considering that this O₂ concentration exists in some parts of the BM hematopoietic stem cell niche, and at 20% O₂, which is commonly used for *ex vivo* cultures [27,28]. Also, MStroC preconditioning at very low O₂, taking into account the metabolic state of the stem cells as well as the host tissue microenvironment (e.g., after ischemic insults), may optimize engraftment efficiency and improve post-transplantation cell survival [29–34]. These analyses concern the proliferative capacity of single cells as well as their differentiation potential. Our results show an enrichment in multi-potent primitive cells (the most closely related to MSC) in the population expressing ALDH, but this is neither exclusive nor specific since the ALDH^{low} cell population also contains a substantial proportion of these cells. Thus, our results do not support the claim of ALDH expression being a specific stem cell marker. However, the significant novelty comes from the fact that the ROS^{high} cell population was found to be composed almost exclusively of ALDH^{low} cells and devoid of stem and progenitor cells. Thus, significant MSC enrichment might be accomplished by a combined sorting approach based on ALDH^{high} and ROS^{low} expression, which is especially pronounced at the very low O₂ concentration.

Material and Methods

Samples and cell cultures

Human healthy bone marrow samples (allogenic transplantation donors) were collected from marrow filters (mononucleated bone

marrow cell fraction) used in hematopoietic graft processing. The use of these cells for scientific research purposes in our laboratory was approved by the National Ministry of Education & Research of the French Republic in accordance with the applicable regulatory procedures (file N°: DC-2018-3143). MStroCs were amplified in alpha-MEM medium (Minimum Essential Medium Alpha Modification) (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (Hyclone GE Healthcare Life Science, Grand Island, NY, USA), 1 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF, Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France), 1% v/v Ultra Glutamine (Lonza, Bâle, Switzerland) and 100 U/mL penicillin/streptomycin 100 U/mL and 1000 U/mL (CliniScience, Nanterre, France) in T175 flasks (Incubator Binder, 5% CO₂, 20–21% O₂, 37°C fully water-saturated atmosphere) until reaching complete confluence. They were then detached and cryopreserved for experimental use (0 passage mesenchymal stromal cells – “MStroC”).

ALDH activity staining

MStroC from different donors were thawed and plated in the same medium as previously described for amplification, in T75 flasks. Cells were incubated under two oxygen concentrations: 20% (20–21% O₂, 5% CO₂, Incubator Igo 150 Cell Life; Jouan, St. Herblain, France) or 0.1% O₂ (0.1% O₂ and 5% CO₂ controlled-culture chamber in a Biospherix Xvivo System) for 4 days. At the end of the 0.1% O₂ incubation period, MStroC cultures were trypsinized, rapidly rinsed in PBS in the working chamber (Biospherix Xvivo System, 1% O₂), and labeled for ALDH using an Aldefluor reagent (ALDF) (Stem Cell Technologies, Grenoble, France) according to the manufacturer's instructions. The reagents were degassed for 24 h at 0.1% O₂ prior to labeling. Activated ALDF substrate was then quickly added to a suspension of 1 × 10⁵ cells in 1 mL of ALDF assay buffer and incubated for 30 min at 37°C in the dark in the culture chamber at 0.1% O₂ in a Biospherix Xvivo System. For the MStroC cultures at 20% O₂, the labeling procedure was performed in a conventional ambient airflow laminar hood and standard cell incubator (20–21% O₂, 5% CO₂, 37°C). As a negative control, an aliquot of ALDF-stained cells was incubated with the ALDH inhibitor diethylaminobenzaldehyde. Cells were then resuspended in 500 μL of ALDF assay buffer before being analyzed on a flow cytometer (BD Bioscience, FACS Canto II) and/or sorted by fluorescence-activated cell sorting (BD FACSARIA III Cell Sorter). MStroC sorted based on ALDH activity only were assayed in singlet cell analysis and energetic measurements. MStroC selected based on ALDH activity and mitochondrial ROS content were utilized for the single-cell assay, phenotypic analysis and secretome analysis.

Oxidative status of cultured cells

MStroC cells were incubated for 4 days at 0.1% O₂ or 20% O₂ (standard condition), immediately labeled for ALDH activity, and then assessed for mitochondrial ROS generation or reduced/oxidized glutathione content. To detect mitochondrial ROS, MStroC were incubated with 5 μM MitoSox (MSX) marker for preferential detection of superoxide (Invitrogen, CA, USA) simultaneously with the ALDF reagent following the procedure described for ALDH activity staining. Co-labeled cells were washed, resuspended and analyzed on a flow cytometer (BD Bioscience, FACS Canto II), and/or sorted based on combined ALDH activity and MSX content using fluorescence-activated cell sorting (BD FACSARIA™ III Cell Sorter) for single-cell analysis.

The glutathione redox profile was assessed as follows: Sorted cells from ALDH^{high} and ALDH low fractions were seeded at 3 × 10³ cells per well in a 96-well plate in culture media for another 4 days under 0.1% O₂ and 20% O₂. Then, the cells were lysed and processed. The ratio of reduced and oxidized glutathione was measured using the luminescent GSH/GSSG-Glo assay kit (Promega, Charbonnières-

les-Bains, France) according to the manufacturer's protocol. Luminescence was measured using a Glomax luminometer (Promega). GSH/GSSG ratios were calculated from relative luminescence unit measurements after interpolating glutathione concentrations from standard curves.

Immunophenotypic characterization

MStroC tissues from cultures incubated at 0.1% O₂ or 20% O₂ were triple-labeled with the ALDF reagent for ALDH activity, MSX for ROS content as described above, and one of the monoclonal immunofluorescent antibodies: anti-CD54 (BV423), anti-CD58 (APC) and anti-CD106 (APC-Vio 770) (all from Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). MStroC were incubated simultaneously for 30 min at 37°C in the dark with the MSX marker and ALDF reagent following the procedure described above, along with 3 μL of each antibody. The labeled cells were then washed, resuspended and analyzed on a flow cytometer (BD Bioscience, FACS Canto II).

Single clone analysis

Proliferative capacity

Limited dilutions of the cell suspension obtained from each sorted experimental condition at a concentration of 0.3 cells/100 μL

were manually distributed into 96-well plates (ALDH^{high}/20% O₂, ALDH^{low}/20% O₂, ALDH^{high}/0.1% O₂, ALDH^{low}/0.1% O₂, ALDH^{high}/MSX^{low}/20% O₂, ALDH^{low}/MSX^{high}/20% O₂, ALDH^{low}/MSX^{low}/20% O₂, ALDH^{high}/MSX^{low}/0.1% O₂, ALDH^{low}/MSX^{high}/0.1% O₂ and ALDH^{low}/MSX^{low}/0.1% O₂). Immediately afterward, through microscopic examination, only wells containing a single, individual cell were considered positive and marked. Any rare wells containing two cells were excluded from further analysis. [35]. Plates were then incubated at 20% O₂ and 5% CO₂ at 37°C. After 14 days, the wells were examined for the presence of colonies. In wells where colonies were observed, the entire cell content generated in the primary culture from a single individual cell was transferred into one well of six-well plates under the same culture conditions (Figure 1a). The cell content of the secondary culture was reassessed after another 14 days. The colonies were observed, and the percentage of positive wells was recorded and analyzed.

The method was performed as was previously published [35]:

Differentiation potential

To assess the differentiation potential of single MStroC (from the same donor) under each of the experimental conditions (as outlined above), single cells were incubated in the same manner as described for the analysis of proliferative capacity. After 14 days, wells containing colonies derived from single cells were trypsinized and divided

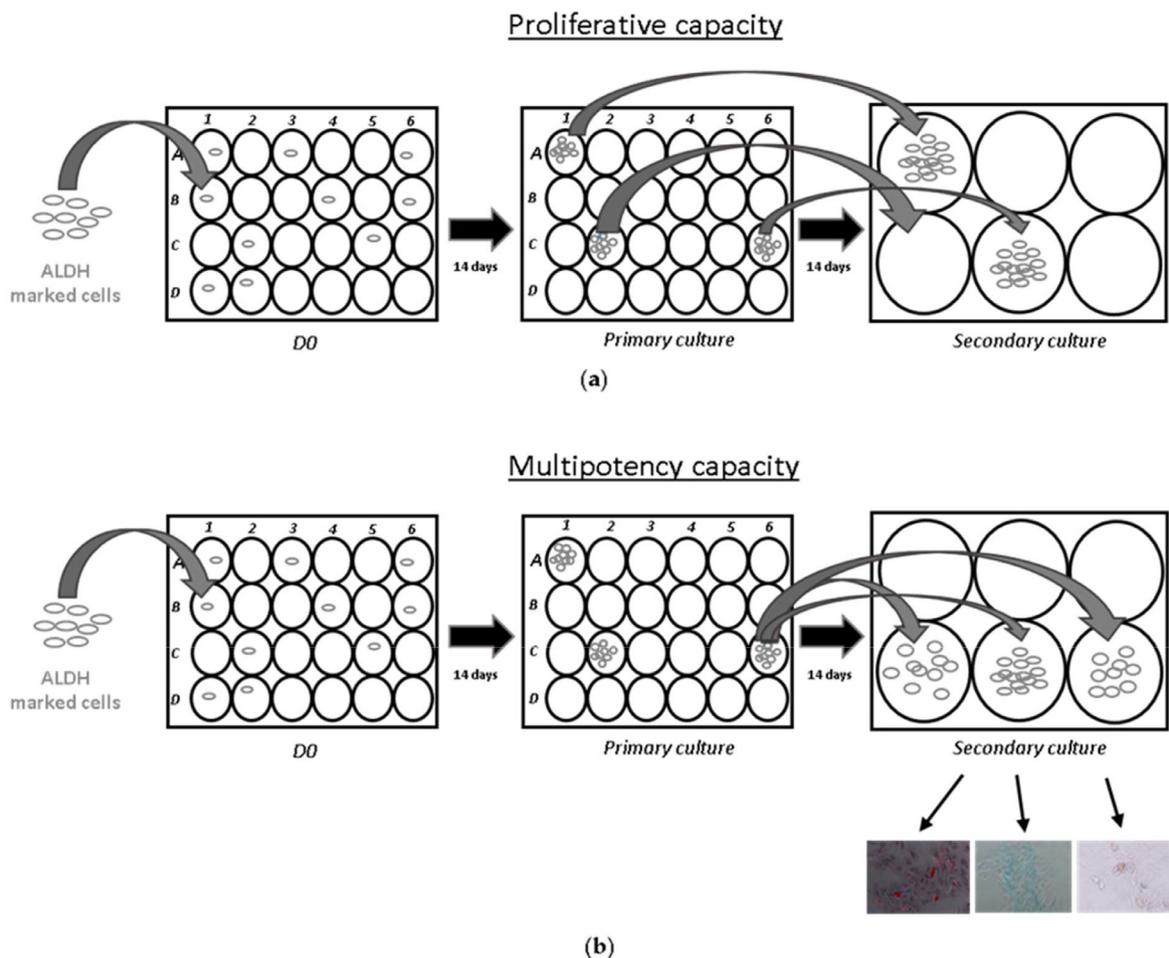


Fig. 1. Single-cell proliferative and differentiation capacity evaluation approach: (a) proliferative capacity using the single-cell primary and secondary cultures approach: the mesenchymal stromal cells were labeled for ALDH and sorted by flow cytometry based on ALDH expression after 4 days of culture exposed to low (0.1% O₂) or high (20% O₂) oxygen concentrations. After sorting, the cells (one cell per well) were plated in primary cultures. After 14 days, the total cell content of a colony was transferred to a secondary culture and analyzed after another 14 days. (b) Differentiation potential evaluated using the single-cell differentiation cultures approach: The MStroC were labeled, sorted and plated as described in (a). After 14 days, the cell content of each well yielding a colony was split into three separate wells. The cellular content of each of these three wells was then subjected to a differentiation pathway.

into three separate wells, each providing conditions for one of three differentiation pathways: osteogenic, adipogenic or chondrogenic (using the StemPro Osteogenesis kit, StemPro Chondrogenesis kit and StemPro Adipogenesis kit, respectively, from Asnières-sur-Seine, France) (Figure 1b). Subsequently, the wells were stained according to the specific differentiation condition: Alcian Blue (Sigma, S. Louis, MO, USA) for chondrocytes, Red Oil (Sigma) and Hematoxylin (Sigma) for adipocytes after 14 days, and Alizarin Red S (Sigma) to confirm the presence of osteocytes after 21 days in culture.

Immunofluorescence microscopy

MStroC were plated in flat-bottom 24-well plates (3×10^4 cells/well) and cultured at 0.1% O_2 and under standard conditions of 20% O_2 for 4 days. After incubation, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and labeled with a solution of HBSS-MSX (5 μ M) for 30 min. Cells were then imaged using a laser scanning confocal microscope (Leica M210f, Leica Micro-system Ltd, Heerbrugg, Switzerland).

Bioenergetic analysis with XF Seahorse Analyzer

We used the XF24 Seahorse Analyzer (Agilent Technologies, Les Ulis, France) to simultaneously estimate the oxygen consumption rate (OCR), a measure of cellular respiration, and the extracellular acidification rate (ECAR), primarily an indicator of lactate and bicarbonate production. These parameters were determined simultaneously using the XF24 Analyzer [36–38]. MStroC were cultured at 0.1% and 20% O_2 in 24-well XF V7 plates at a cell density set to achieve 5×10^4 cells/well after 4 days of culture in growth medium for each experimental condition. At the time of assessment, the growth medium was replaced with the appropriate assay medium (see below), and the plates were placed in a 37°C non- CO_2 incubator for 30 min while the sensor cartridge was calibrated. In a typical experiment, three baseline measurements were recorded before the addition of any compounds, followed by three response measurements after the addition of each compound. OCR and ECAR were reported as average values from triplicate absolute rates (pmoles/min for OCR and mpH/min for ECAR) or as a percentage of the baseline level, using the third basal level measurement as the baseline. All modulators used for Seahorse measurements were provided by Sigma-Aldrich, MO, USA.

Mitochondrial respiration

The parameters of mitochondrial respiration were evaluated in the assay medium, which consisted of bicarbonate-free DMEM (Agilent Technologies) supplemented with 25 mM glucose, 1 mM pyruvate and 2 mM glutamine. Mitochondrial respiration was monitored in the basal state (measurements 1–3) and after sequential injections of the mitochondrial modulators: oligomycin (1 μ M; measurements 4–6), 2,4-dinitrophenylhydrazine (100 μ M; measurements 7–9) and antimycin/rotenone (ant/rot; 1 μ M; measurements 10–12) [36]. This assay allows for the estimation of several key parameters of cellular respiration: (i) basal cellular respiration, calculated as the mean of OCR values from measurements 1–3; (ii) coupled respiration, representing the portion of respiration associated with adenosine triphosphate (ATP) production from oxidative phosphorylation. This is calculated as the mean basal OCR minus the mean OCR values from measurements 4–6 after oligomycin injection (oligomycin-resistant respiration). (iii) Proton leak, calculated as the difference between oligomycin-resistant respiration and the mean OCR values from measurements 10–12 after ant/rot (antimycin/rotenone) injection; (iv) maximal respiration, determined as the mean OCR values from measurements 7–9 after 2,4-dinitrophenylhydrazine injection; (v) spare respiratory capacity, calculated as the difference between maximal respiration and basal respiration; (vi) non-mitochondrial respiration (NMR), represented by the mean OCR values from

measurements 10–12 after ant/rot injection; (vii) mitochondrial respiration, calculated as basal cellular respiration minus NMR [36,37].

Glycolytic activity

We estimated glycolytic parameters as previously published [36,38]. The assay medium used was the base medium without any supplementation of exogenous fuel substrates. ECAR values were assessed in the basal state (measurements 1–3) and after sequential injections of 10 mM glucose (measurements 4–6), oligomycin (1 μ M; measurements 7–9), 2-deoxyglucose (2-DG; 100 mM; measurements 10–12), and antimycin/rotenone (ant/rot; 1 μ M) [29]. The increase in ECAR following the addition of glucose to cells incubated in glucose-free medium indicates the glycolytic rate. This is calculated as the mean of ECAR values after glucose injection minus the mean of basal ECAR levels. Any acidification resulting from other metabolic processes, such as CO_2 release from the Krebs cycle, is detected as the basal ECAR before glucose addition. The subsequent addition of oligomycin increases glycolytic flux in response to a deficiency in mitochondrial ATP production, aiming to maintain cellular ATP homeostasis. This is referred to as glycolytic capacity. The consecutive addition of the glycolysis inhibitor 2-DG eliminates the glucose-induced ECAR increase, revealing non-glycolytic acidification. The anaerobic glycolytic rate (ECAR related to glycolytic lactate production) is calculated as the mean of ECAR values after glucose injection minus the mean of ECAR levels detected after 2-DG injection.

Bead-based multiplex secretom analysis

To characterize the cytokine or extracellular vesicles (EVs) profile of sorted MStroC fractions ($ALDH^{high}MSX^{low}$ and $ALDH^{low}MSX^{low}$), the cells were cultured in a 24-well plate for 7–8 days under the same oxygenation conditions as the initial culture before sorting (20% O_2 or 0.1% O_2). Subsequently, the culture supernatants were collected, centrifuged, and the resulting supernatants were stored at $-80^\circ C$ until further characterization by flow cytometry. As a control, culture medium without cells was also incubated, centrifuged and stored under the same culture conditions as the cells. To determine the concentrations of soluble cytokines in each sample, the cell culture supernatants were subjected to bead-based multiplex cytokine analysis using flow cytometry (MACSplex Cytokine 12 Kit human, Miltenyi Biotec). This analysis utilized MACSplex Capture Beads, which are a mixture of various fluorescently labeled bead populations, each coated with a specific antibody reacting with one of the respective analytes within the sample. The samples or culture medium only were incubated with the antibody-coated MACSplex Capture Beads on an orbital shaker (1400 rpm), washed in MACSplex Buffer, and then the cytokines bound to specific capture beads were labeled with the MACSplex Cytokine 12 Detection Reagent. This detection reagent is a cocktail of APC-conjugated anti-cytokine antibodies. After another wash, the samples were analyzed on a flow cytometer (FACSCanto II, Becton Dickinson, France). The kit includes standards of known quantities of the analytes, which were used for quantification of the cytokines in the samples.

To determine the presence of specific EVs in each sample, the cell culture supernatants were subjected to bead-based multiplex EV analysis using flow cytometry (MACSplex EV Kit IO human, Miltenyi Biotec). The samples or culture medium only were incubated with MACSplex Exosome Capture Beads, which contain 39 different antibody-coated beads, on an orbital shaker (450 rpm) (List of antibody-coated beads is presented in Supplementary Table 1). After washing, the EVs bound to the MACSplex Exosome Capture Beads were labeled with the MACSplex Exosome Detection Reagent, which contains APC-conjugated anti-CD9, anti-CD63, and anti-CD81 antibodies. Following another wash, the samples were analyzed on a flow cytometer (FACSCanto II). Similar to the cytokine analysis, the raw APC mean fluorescence intensity (MFI) for all surface epitope capture bead subsets was

corrected by subtracting the corresponding MFI values obtained with medium without cells prepared under the same conditions as the samples. Each result was then normalized with the number of cells in the sample and the total supernatant volume.

Statistical analysis

In the absence of normal distribution, our samples were analyzed using the Kruskal–Wallis test followed by the non-parametric Wilcoxon–Mann–Whitney paired comparison test to examine the significance of the differences between experimental conditions. Proportions were compared using the chi-square test. Statistical significance was considered at $P < 0.05$.

Results

Proliferative and differentiation potential of the individual ALDH^{high} or ALDH^{low} MStroC

To analyze the content of progenitor cells capable of generating primary colonies (equivalent to CFU-F in bulk cell assays), as well as more primitive progenitors/stem cells capable of generating colonies in secondary cultures, single cells from the first passage were plated and assessed for their ability to generate a primary colony (Figure 1a). Subsequently, primary colonies were individually replated and assessed for their ability to generate secondary colonies. This approach allowed us to determine the proportion of initial MStroC cells giving rise to both primary and secondary colonies (Figure 2a,b). The proportion of individual ALDH^{high} MStroC cells forming primary colonies was slightly, but not significantly, different regardless of the O₂ culture condition (Figure 2a). In contrast, a significantly higher proportion of cells capable of forming secondary colonies was detected in ALDH^{high} MStroC cells, specifically in cultures under 0.1% O₂ (Figure 2b). When considering the fraction of cells capable of forming colonies in primary cultures and still producing colonies in secondary cultures, it was significantly higher in the ALDH^{high} subpopulation cultured at 0.1% O₂ compared to other conditions (Figure 2c). These findings indicate that MSCs with high proliferative capacity are particularly enriched in ALDH^{high} MStroC cells exposed to low O₂.

To analyze the differentiation potential of individual stem/progenitor cells, we performed single-clone analysis in which the total cellular content of one well of the primary culture (if a colony appeared) was transferred into three separate wells of secondary culture. Each of these three wells contained a specific condition to induce a differentiation pathway: lipogenic, chondrogenic and osteogenic (Figure 2d). Irrespective of the O₂ concentration, a relatively higher proportion of cells exhibiting multi-potent characteristics across all three lineages was observed in the ALDH^{high} population. However, a significantly lower proportion of multi-potent cells was found in cultures exposed to 20% O₂ compared to those exposed to 0.1% O₂, whether the cells were ALDH^{high} or ALDH^{low}. It appears that the proportion of bi-lineage and one-lineage progenitors does not differ significantly based on ALDH expression and O₂ concentration. Thus, our results collectively demonstrate that the ALDH^{high} cell population is enriched in high proliferative capacity multi-potent stem/progenitor mesenchymal cells, particularly 0.1% O₂.

Oxidative status of ALDH^{high} versus ALDH^{low} MStroC

The beneficial effect of 0.1% O₂ on stem cell enrichment in the ALDH^{high} population is consistent with the fact that the hyperoxic 20% O₂ concentration is known to induce elevated ROS production resulting in oxidative stress, particularly harmful for stem cells [39]. This prompted us to analyze the oxidative status of cultured cells (Figure 3). Our results showed that the overall mitochondrial

superoxide anion production, measured using MSX expression (MSX^{high} cells), was significantly higher at 20% O₂ compared to 0.1% O₂ cultures (Figure 3a,b). Additionally, a majority of these MSX^{high} cells were ALDH^{low} regardless of the O₂ concentration used (Figure S1). To elucidate the capacity of stem cells to cope with this higher ROS production, we estimated the levels of reduced and oxidized glutathione, one of the main cellular antioxidants (Figure 3c). In general, a significantly higher concentration of oxidized glutathione (GSSG) was found in the cultures incubated at 20% O₂, with no difference noted between the ALDH^{high} and ALDH^{low} fractions. At 0.1% O₂, both fractions contained a significantly lower concentration of GSSG (Fig. 3c). Since a higher ratio of GSH/GSSG persists in the ALDH^{high} fraction at 0.1% O₂ (Fig. 3d), it can be deduced that the concentration of reduced glutathione (GSH) in this condition remained high. At 20% O₂, the ratio is also high despite a high concentration of GSSG, highly suggesting a compensatory production of GSH. We observed at 20% O₂ a significantly higher concentration and content of oxidized glutathione (GSSG) compared to cultures exposed to 0.1% O₂ (Figure 3c). This suggests that at 20% O₂, regardless of ALDH expression, a higher level of ROS content (Figure 3a) induces glutathione production to reduce the oxidative stress. In contrast, at 0.1% O₂, a significantly higher level of GSSG was detected in the ALDH^{low} population compared to the ALDH^{high} MStroC (Figure 3d). This was related to the elevated ROS production detected almost exclusively in the ALDH^{low} population (Figure 3a). Considering that mitochondria are the main source of cellular ROS production [40], we measured the mitochondrial activity and glycolytic rate in cultures incubated at low or 20% O₂. Our results showed a significantly higher mitochondrial respiration in MStroC at 20% O₂ (Figure S2a,b), while a clear increase in glycolytic rate and anaerobic glycolytic energetic orientation occurred at 0.1% O₂ (Figure S2c,d). Altogether, our results indicate that in cultures exposed to 0.1% O₂, the ALDH^{high} population enriched in stem/progenitors cells (Figure 2) is metabolically poised to counteract oxidative stress.

Single-cell proliferative and differentiation potential with respect to ALDH and MSX expression

We hypothesized that, due to the sensitivity of primitive cells to oxygen, the fraction enriched in ALDH^{high}MSX^{low} cells would contain a higher proportion of stem cells. To test this, at the end of the incubation period at 0.1% O₂ and 20% O₂, cells were selected, and individual ALDH^{high}MSX^{low}, ALDH^{low}MSX^{high} and ALDH^{low}MSX^{low} cells were assayed for their proliferative capacity and differentiation potential in a single-cell assay (Figure 4). We did not select the ALDH^{high}/MSX^{high} fraction since it was numerically negligible. Cells with a high proliferative capacity, able to generate either primary or secondary colonies, were concentrated exclusively in the MSX^{low} fraction, and such cells were not found in the MSX^{high} fraction, irrespective of O₂ condition (Figure 4a,b). However, a significantly higher proportion of cells incubated at 0.1% O₂ with the MSX^{low} phenotype generated secondary colonies (Figure 4b). Furthermore, a higher proportion of cells generating primary colonies and able to give secondary colonies was found in the MSX^{low} fraction, irrespective of ALDH expression (Figure 4c versus Figure 2c). When considering only the MSX^{low} population, the cells with the highest capacity for secondary colony formation were mainly ALDH^{high}. This was especially pronounced at 0.1% O₂, where virtually all colony-forming cells (96%) were able to generate secondary colonies (Figure 4c).

Regarding differentiation potential, it is evident that the proportion of tripotent colony-forming cells is generally higher for all conditions in the MSX^{low} fraction than in the total population containing all fractions with respect to MSX expression (Figure 4d versus Figure 2d). Once again, a relatively higher proportion of MSX^{low} colony-forming cells were tripotent at 0.1% O₂ compared to 20% O₂, which is especially significant for the ALDH^{high} fraction. Therefore,

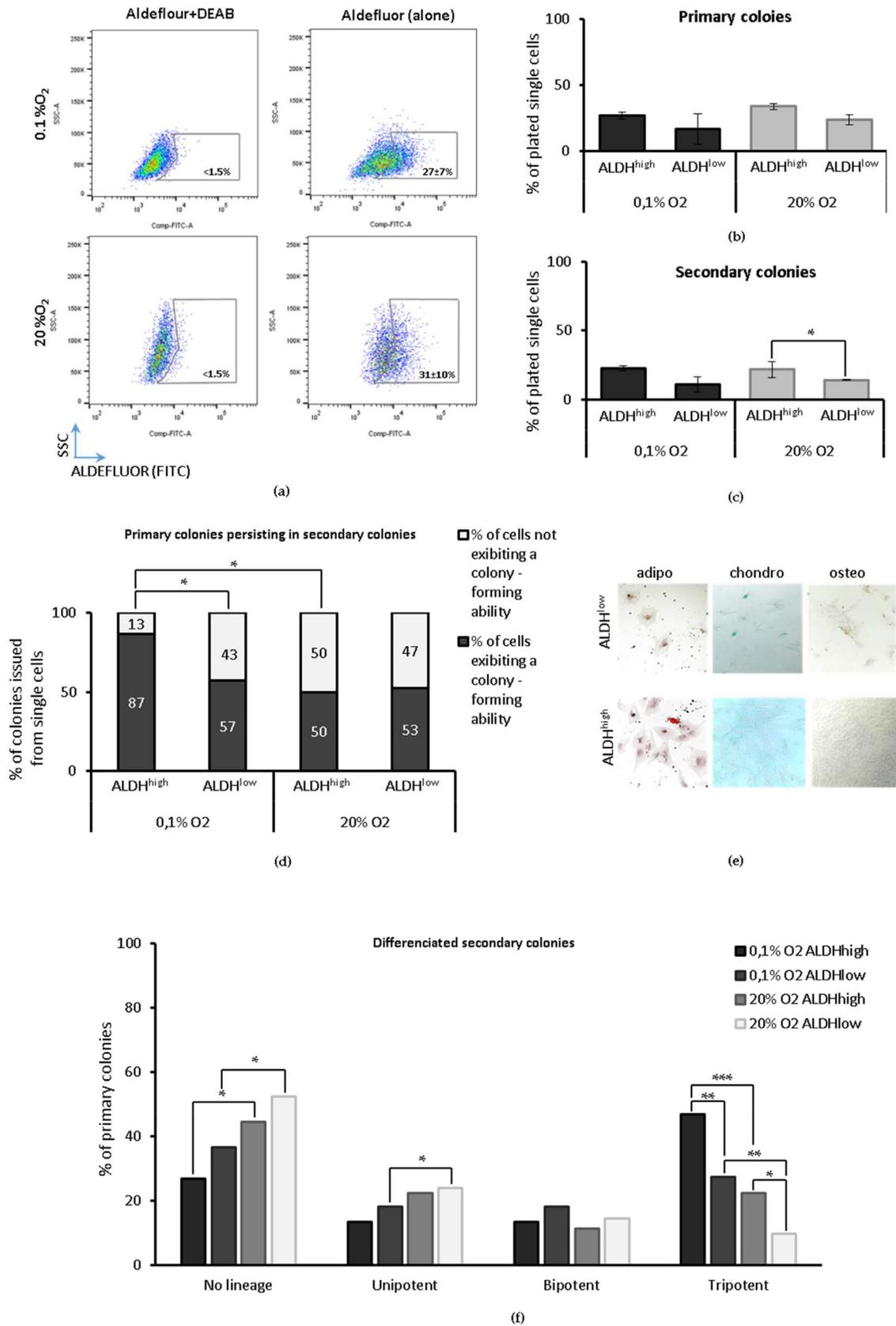


Fig. 2. Enrichment of stem and progenitor cells. (a) Representative flow cytometry plots showing the selection of human BM-derived MStroC with low versus high ALDH-activity (ALDH^{high}) using the Aldefluor™ assay. ALDH^{high} gating is established by incubating Aldefluor™-reacted cells with the ALDH inhibitor diethylaminobenzaldehyde (negative control). An ALDH/side scatter (SSC) plot is shown. (b) Percentage of clonogenic cells in primary cultures; (c) percentage of cells seeded in primary single-cell cultures yielding clones proliferating in secondary culture; (d) percentage of primary clones continuing to proliferate in the secondary cultures; (e) images from an inverted microscope of BM-derived MStroC differentiated into osteocytes, chondrocytes, and adipocytes; (f) percentage of uni-, bi- or tri-potent clones. Asterisks indicate a statistically significant difference between experimental conditions at * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, using the chi-square test. The number of total single cells analyzed for 0.1% O₂ = 99 (ALDH^{high}), 105 (ALDH^{low}), and for 20% O₂ = 118 (ALDH^{high}), 134 (ALDH^{low}), from two different donors.

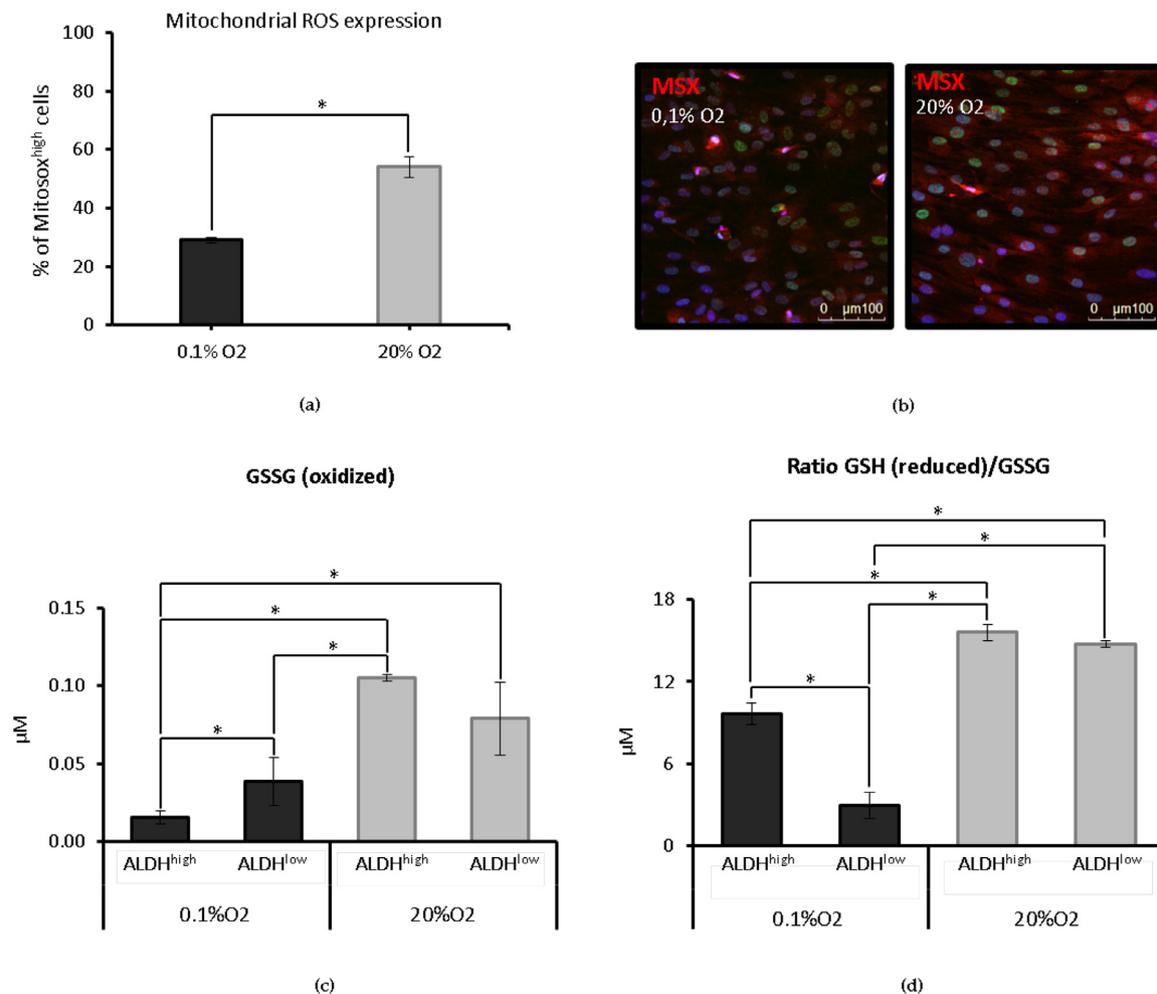


Fig. 3. Oxidative profile of cells and anti-oxidative capacity. (a) Percentage of fluorescence intensity detected by MSX-based flow cytometry (mitochondrial ROS) in the total mesenchymal stromal cell population at control (20% O₂) and low oxygen concentration (0.1% O₂). Number of donors = 3; (b) MSX (red) and Dapi (nuclei in blue) labeled cells detected by confocal microscopy in the total MStroC population at control (20% O₂) and low oxygen concentration (0.1% O₂). Pictures representative for 2 donors; (c) concentration of oxidized glutathione (GSSG) measured using the Promega luminescence kit after sorting based on ALDH expression at control (20% O₂) and low oxygen concentration (0.1% O₂). Number of donors = 4; (d) ratio of reduced/oxidized glutathione (GSH/GSSG) calculated from their respective concentrations in fractions obtained as described in (c). Number of donors = 4. Asterisks indicate a statistically significant difference between experimental conditions at **P* < 0.05, Wilcoxon–Mann–Whitney test.

the MSX^{low} population, regardless of ALDH expression and O₂ concentration used, provides an enrichment in highly proliferative and multi-potent stem/progenitor mesenchymal cells. Additionally, the absence of difference between ALDH^{high}MSX^{low} and ALDH^{low}/MSX^{low} in the MStroC culture obtained at 20% O₂ might suggest that ROS content is a more valuable criterion for the selection of stem cell-like MStroC than the expression of ALDH.

Phenotypic, cytokine and extracellular vesicle profile in respect to ALDH and MSX expression

In order to further characterize the selected MStroC population based on ALDH activity, we determined their phenotypic profile. Thus, we evaluated the expression of common MStroC antigens CD146 (MCAM), CD106 (VCAM), CD54 (ICAM) and CD58 (LFA-3), known to be differently expressed in a tissue-dependent manner, culture passage, genetic, and functional properties [17,41].

The expression of CD54, CD106 and CD146, regarding the percentage of MStroC positive cells as well as the mean fluorescence intensity (MFI) for CD146, is significantly higher in the ALDH^{high} fraction compared to the ALDH^{low} fraction at both O₂ culture conditions (% MFI for all four conditions). Additionally, the percentage of MStroC expressing these markers is significantly increased in the cultures from hyperoxia (20% O₂) compared to the 0.1% O₂ condition. The

percentage of MStroC expressing CD58 was equal regardless of ALDH activity and culture O₂ condition, while its MFI was slightly higher in cells from 20% O₂ (Figure 5a,b). Next, we evaluated if the populations sorted according to ALDH activity and ROS content are different in respect to their cytokine secretion. Using the multiplex cytokine analysis, we identified IL-4, IL-9, IL-10 and IL-17 in the culture supernatants. The IL-10 content was the most abundant in the ALDH^{high} fraction from cultures at 0.1% O₂ compared to ALDH^{low} and to both ALDH^{high} and ALDH^{low} fractions at 20% O₂. The most abundant secretion of IL-17 and IL-9 was detected in the ALDH^{high} fraction in hyperoxia. Also, a low level of IL-4 was detected in all conditions except in the low O₂ ALDH^{high} condition.

In addition to cytokines, the MStroC secretome contains EVs mediating many of the therapeutic functions [42]. EVs are classified by their size, composition and specific surface antigen expression. We utilized the bead-based multiplex assay comprising 37 labeled capture bead populations, each coated with different monoclonal antibodies against individual EV surface antigens (Supplementary Table 3). We identified the EVs expressing markers including CD49e (integrin α -5), CD29 (integrin β -1), CD63 and CD81 (tetraspanins), CD44 (a surface glycoprotein involved in cell adhesion and migration), CD105 endoglin (an accessory receptor for transforming growth factor beta [TGF- β]) and melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan, in the culture supernatant of MStroC from

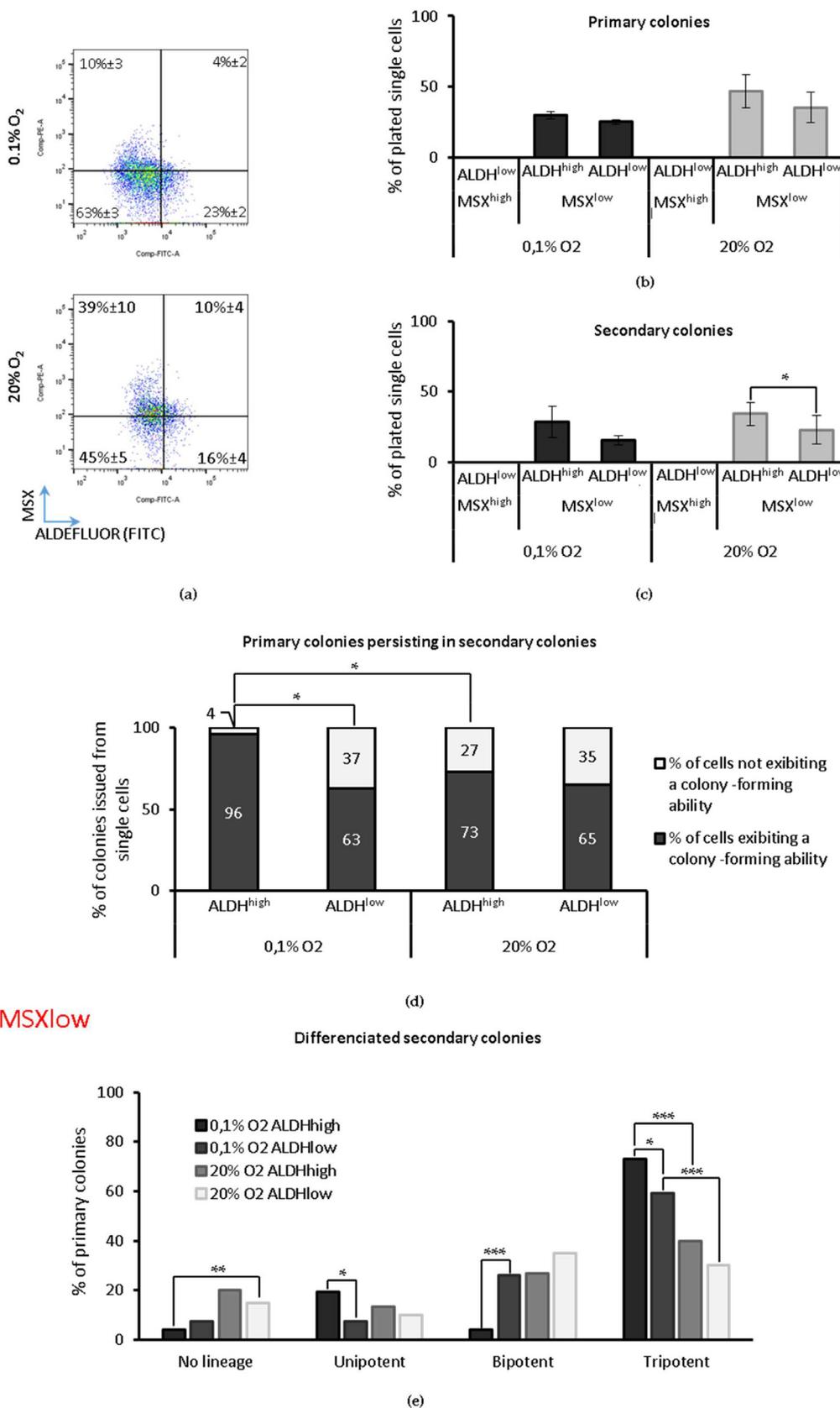


Fig. 4. The exclusion of ROS (MSX^{high}) expressing cells enriches stem cells. The proliferative capacity and multi-potency were determined by single-cell primary and secondary cultures approach as described in Figure 1. The culture conditions were the same as described in Figure 1. (a) Percentage of clonogenic cells in primary cultures; (b) percentage in secondary cultures (cells seeded in primary single-cell cultures yielding clones proliferating in secondary culture); (c) percentage of primary clones continuing to proliferate in the secondary cultures; (d) percentage of uni-, bi- or tri-potency of clones. Asterisks indicate a statistically significant difference between experimental conditions at *P < 0.05, ***P < 0.001, chi-square test. Number of total single cells analyzed for 0.1% O₂ = 31 (ALDH^{high}/MSX^{high}), 64 (ALDH^{low}/MSX^{low}), 77 (ALDH^{low}/MSX^{high}) and for 20% O₂ = 37 (ALDH^{high}/MSX^{high}), 65 (ALDH^{low}/MSX^{low}), 64 (ALDH^{low}/MSX^{high}), issued from two different donors.

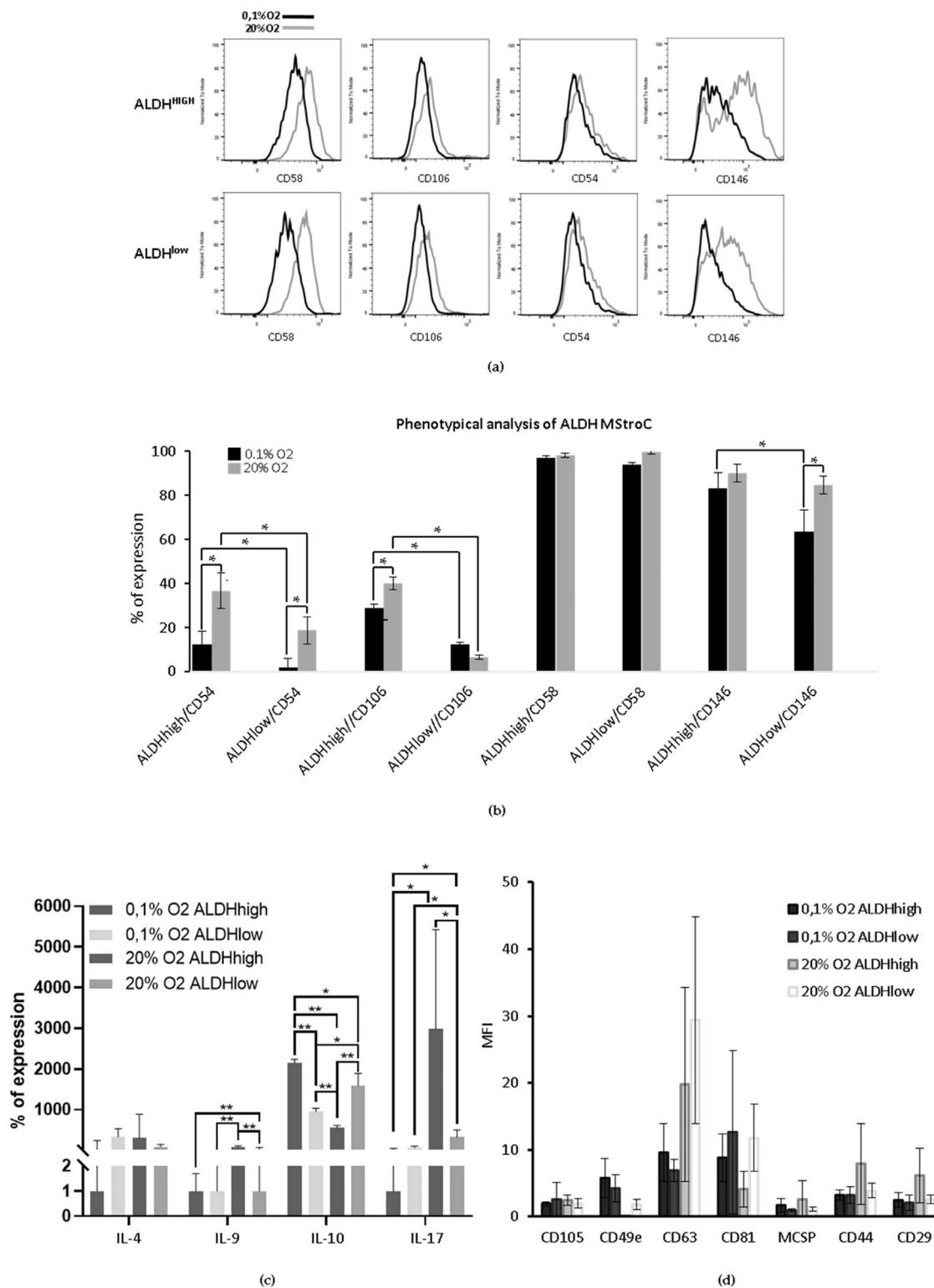


Fig. 5. Phenotypal and secretory profile. (a,b). The expression of CD58, CD106, CD54 and CD146 receptors in the ALDH^{high} and ALDH^{low} MStroC populations after 5 days at 0.1% O₂ and 20% O₂. Representative cytometric histograms (a) showing the mean percentage \pm SD of expression from six independent experiments, each performed with individual MStroC donors (b). (c) The bars represent the mean \pm SD cytokine content of IL-4, IL-9, IL-10 and IL-17a identified in the supernatant of the 5-day culture initiated with sorted ALDH^{high} or ALDH^{low} MStroC fractions. The cytokine quantification was performed by the MACSPlex[®] cytokine bead-based assay in four independent experiments using four individual donors. (d) Under the same conditions as (c), the specific antigen expression profile of the extracellular vesicles collected from the culture supernatant. The bars are presented as the mean percentage of expression \pm SD from four independent experiments. The EV profile was determined by the MACSPlex EV Assay. Number of donors = 4. Asterisks indicate a statistically significant difference between experimental conditions at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Wilcoxon–Mann–Whitney test.

either culture O₂ condition without significant differences. However, we noticed a slightly increased CD49e expressing EVs isolated from the 0.1% O₂ ALDH^{high}MSX^{low} fraction, as well as CD44 and CD29 expressing EVs isolated from the 20% O₂ ALDH^{high}MSX^{low} fraction. This indicates that these EVs are enriched in the MStroC belonging to a more primitive compartment.

Discussion

Our study provides a novel sorting technique allowing almost exclusive enrichment of high proliferative MSC-like cells with multi-lineage potential.

Previous studies have indicated that the ALDH^{high} population of MStroC exhibits a transcriptional profile typical of stem cells [17]. However, these results were obtained using the bulk MStroC population, which is polyclonal. As a result, functional analyses are required to confirm the specificity of ALDH expression for MS [16]. To test this hypothesis, we employed a pertinent experimental approach: single clone functional analysis in serial cultures to determine the proliferative capacity and differentiation potential at the single-cell level [2,3]. This approach enables the detection of high proliferative potential mesenchymal cells, as previously reported [23]. Although our approach is not an *in vivo* stem cell assay (a standardized MSC *in vivo* assay is still lacking due to complexity and several biological limitations) [43], it is logical that mesenchymal stem cells reside in a cell population exhibiting a high proliferative capacity and a three-lineage differentiation potential (considered “multi-potency”) [3]. Furthermore, within the bone marrow, some micro-environmental niches are estimated to be severely hypoxic, nearly anoxic [27,28].

In this study, we demonstrate that the selection of MStroC based on ALDH expression enables enrichment in both MSC (cells with high proliferative potential and multi-potency) and committed mesenchymal progenitors (cells with limited potential for differentiation, two- or one-lineages). Notably, the concentration of cells with the highest proliferative capacity (ability to generate colonies in secondary cultures) is enhanced in the ALDH^{high} fraction only when MStroC were cultured at 0.1% O₂. The lack of ALDH selectivity at 20% O₂ may be associated with the fact that ALDH represents a family of enzymes presented in multiple isoforms, and the ALDF reagent could react with nine of them [22]. This was identified in the labeling procedure conducted at 20% O₂. In our study, the ALDF labeling procedure was performed at the corresponding O₂ concentration (0.1–1% O₂ for MStroC culture obtained at 0.1% O₂ and 20% O₂ for the MStroC culture obtained at 20% O₂). It is possible that different isoforms are expressed and labeled in response to the O₂ concentration. Thus, it may be that the isoform particularly enriched in stem cells is expressed at low O₂, in contrast to 20% O₂ where less selective stem cell isoforms are labeled [22,44]. However, we should not exclude the possibility that the ALDH-selective MSC expression at low O₂ is also associated with the specific molecular metabolic epigenetic setup, which is lost in hyperoxic culture (20% O₂). This could potentially explain the absence of ALDH selectivity concerning the clonogenic potential of MStroC cultured at 20% O₂.

On the other hand, the criterion of ALDH positivity is not specific for either stem or progenitor cells, since both populations are present in the ALDH^{low} fraction, albeit at a relatively lower frequency compared to the ALDH^{high} fraction.

From a physiological perspective, it is expected that cells highly expressing ALDH exhibit lower ROS content, as ALDH acts as an anti-oxidant. Additionally, in all somatic cell models, undifferentiated stem cells are associated with low ROS content [39]. This could explain the relative enrichment of MSC in the ALDH^{high} population, particularly at 0.1% O₂. In these conditions, the discrimination of non-clonogenic MStroC via ROS expression detection is more efficient, enabling a more precise enrichment of MSC. Notably, the ROS^{high} cells

lack clonogenic activity, which was almost exclusive in MStroC cultured at low O₂.

This condition facilitates an anaerobic metabolic setup (Figure S2), which is essential for the optimal survival of stem cells. Furthermore, we found that these features are even more pronounced in the ALDH^{high} versus ALDH^{low} MStroC fractions (data not shown).

To elucidate this phenomenon further, we investigated the relationship between oxidative cell status and the level of stemness. Our results clearly show that total stem cells and committed progenitor activity are found within the fraction exhibiting low content of anion superoxide (MSX, detected by MitoSoX). Moreover, based on our results indicating lower total MSX content at 0.1% compared to 20% O₂, we assessed the anti-oxidative capacity of the cells by measuring not only oxidized glutathione but also the ratio of reduced/oxidized glutathione. We concluded that at 20% O₂, a compensatory mechanism is activated to produce a high level of reduced glutathione. This mechanism is likely used by the cells to counteract higher levels of oxidation. Overall, these data suggest that at 20% O₂, a non-physiological concentration (hyperoxia), mesenchymal stem and progenitor cells are constantly battling oxidative stress. While we did not observe a statistically significant reduction, we noted a tendency toward a decrease in the percentage of ALDH-expressing cells in hyperoxia (20% O₂) compared to 0.1% O₂ cultures (Figure 2a). This might be related to the need for an increase in the detoxifying activity of the enzyme under hyperoxic conditions (20% O₂). Under oxidative stress conditions, more than 200 types of aldehydes are generated, many of which are highly reactive and toxic. ALDH metabolizes endogenous and exogenous aldehydes, thereby abrogating oxidative stress in prokaryotic and eukaryotic organisms [45]. Thus, the rise in ALDH-expressing MStroC in hyperoxia could be related to its increased detoxifying activity. Phenotypic characterization indicates that the expression of the adhesive molecules CD54, CD106, CD146 is segregated in the ALDH population comprising more primitive MStroC with higher proliferative and multi-potent capacity. This is in line with previously published data showing that CD54, CD106, CD146 harbor the ALDH^{high} MStroC fraction with a higher expression of genes associated with stemness such as Nanog and Oct4, as well as HIF. This phenotype is also related to the cells exhibiting a higher multi-lineage potential and hematopoietic supporting capacity [18].

Additionally, our study reveals that the expression of these markers is dependent on the culture oxygenation, being reduced at low O₂ levels.

Regarding the fact that we identified the most abundant secretion of IL-9, IL-10 and IL-17 in the ALDH^{high} MStroC fraction, it indicates that the production/secretion of these cytokines is implicated in the paracrine function of more primitive MStroC. Also, their production is differently regulated with respect to O₂ culture conditions. These are pleiotropic cytokines, known to have immunomodulatory/immunosuppressive (IL-10, IL-17), pro-inflammatory (IL-9, IL-17), osteogenic [46–49] and hematopoietic supportive functions [50,51]. This indicates that conditioned media isolated from ALDH^{high} MStroC might exert the above-described roles in various cell-engineering protocols. Various EVs express different antigen markers and carry specific mRNAs, miRNAs, lipids and proteins [52–54] determining their specific molecular properties [55,56]. Our findings highlight the relevance of cell culture O₂ conditions and ALDH activity as factors influencing the generation and composition of the MStroC-derived EVs. It has been shown that physiological culture conditions can increase the angiogenic potency of MStroC-derived EVs [57] as well as functional properties of MStroC in general [58–60]. The implication of our findings in MStroC functional features, including cell viability, proliferation capacity, differentiation potential and metabolic setup, demands further investigations.

In conclusion, the expression of ALDH cannot be considered an exclusive marker of mesenchymal stem cells since stem cells were also found in the ALDH^{low} cell population and committed progenitors

in the ALDH^{high} fraction. However, this marker can be used for MSC enrichment, especially if combined with MSX labeling, which enables the removal of non-clonogenic cells. Moreover, this point could be particularly interesting for MStroC using cell therapies, since, up to now, no MSC-specific selection markers have been identified. Additionally, the important conclusion of this study concerns the fact that MSC are better maintained at very low oxygen concentrations. At the same time, these three factors are the basic features of MSC maintenance in the stem cell niche environment.

Declaration of Competing Interest

The authors have no commercial, proprietary or financial interest in the products or companies described in this article.

Funding

This project was supported by the annual research budget of EFS-NVAQ.

Author Contributions

Conceptualization and management: Zoran Ivanovic, Marija Vlaski; Methodology and experimental work: Alice Refeyton Veronique Labat, Marija Vlaski; Data analysis: Alice Refeyton, Zoran Ivanovic; Writing: Zoran Ivanovic, Alice Refeyton; Supervision and project administration: Zoran Ivanovic; Funding acquisition: Zoran Ivanovic. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

All data are conserved at the internal server of EFS-NVAQ Bordeaux and are available upon request.

Acknowledgments

The authors acknowledge the proof-reading by Jean Claude Martinou, PhD, Department of cell biology, Faculty of Geneva, Geneva, Switzerland and Elisabeth Doutreloux-Volkman (EFS NVAQ, Bordeaux) for critical reading. The authors thank Atika Zouine and Vincent Pitard for technical assistance at the flow cytometry facility, TBMCore platform in Bordeaux University CNRS UMS 3427, INSERM US 005, Univ. Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jcyt.2024.04.003.

References

- [1] Horwitz EM, Andreeff M, Frassoni F. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol* 2006;13:419–25.
- [2] Phinney DG, Hwa Lee R, Boregowda SV. Revisiting the mesenchymal “stem vs. stromal” cell dichotomy and its implications for development of improved potency metrics. *Stem Cells* 2023;41:444–52.
- [3] Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem Cells* 2019;37:855–64.
- [4] Loncaric D, Labat V, Debeissat C, Brunet de la Grange P, Rodriguez L, Vlaski-Lafarge M, et al. The majority of cells in so-called “mesenchymal stem cell” population are neither stem cells nor progenitors. *Transfus Clin Biol* 2019;26:316–23.
- [5] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–7.
- [6] Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 7):1161–6.
- [7] Lo Surdo J, Bauer SR. Quantitative approaches to detect donor and passage differences in adipogenic potential and clonogenicity in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2012;18:877–89.
- [8] Caplan AL. There is no “stem cell mess.”. *Tissue Eng Part B Rev* 2019;25:291–3.
- [9] Margiana R, Markov A, Zekiy AO, Hamza MU, Al-Dabbagh KA, Al-Zubaidi SH, et al. Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *Stem Cell Res Ther* 2022;13:366.
- [10] Ivanovic Z. Mesenchymal - stem and non-stem - cells: the name of the rose. *Transfus Clin Biol* 2023;30:305–6.
- [11] Vasilio V, Pappa A, Petersen DR. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem Biol Interact* 2000;129:1–19.
- [12] Laskar AA, Danishuddin, Khan SH, Subbarao N, Younus H. Enhancement in the catalytic activity of human salivary aldehyde dehydrogenase by alliin from garlic: implications in aldehyde toxicity and oral health. *Curr Pharm Biotechnol* 2019;20:506–16.
- [13] Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2009;18:17–25.
- [14] Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:9118–23.
- [15] Ahmed Laskar A, Younus H. Aldehyde toxicity and metabolism: the role of aldehyde dehydrogenases in detoxification, drug resistance and carcinogenesis. *Drug Metab Rev* 2019;51:42–64.
- [16] Nishimoto E, Yamada Y, Miyake H, Mitsuya H, Yonemura Y. Isolation of mesenchymal stem cells from human bone marrow using aldehyde dehydrogenase as a marker. *Blood* 2007;110:1929.
- [17] Najjar M, Dollé L, Crompton E, Verhulst S, van Grunsvan LA, Busser H, et al. Isolation and characterization of bone marrow mesenchymal stromal cell subsets in culture based on aldehyde dehydrogenase activity. *Tissue Eng Part C Methods* 2018;24:89–98.
- [18] Najjar M, Crompton E, van Grunsvan LA, Dollé L, Lagneau L. Aldehyde dehydrogenase activity in adipose tissue: isolation and gene expression profile of distinct sub-population of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Rev Rep* 2018;14:599–611.
- [19] Najjar M, Crompton E, van Grunsvan LA, Dollé L, Lagneau L. Aldehyde dehydrogenase activity of Wharton jelly mesenchymal stromal cells: isolation and characterization. *Cytotechnology* 2019;71:427–41.
- [20] Najjar M, Crompton E, van Grunsvan LA, Dollé L, Lagneau L. Foreskin-derived mesenchymal stromal cells with aldehyde dehydrogenase activity: isolation and gene profiling. *BMC Cell Biol* 2018;19:4.
- [21] Sherman AB, Gilger BC, Berglund AK, Schnabel LV. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and stem cell supernatant on equine corneal wound healing in vitro. *Stem Cell Res Ther* 2017;8:120.
- [22] Gomez-Salazar MA, Wang Y, Thottappillil N, Hardy RW, Alexandre M, Höller F, et al. Aldehyde dehydrogenase, a marker of normal and malignant stem cells, typifies mesenchymal progenitors in perivascular niches. *Stem Cells Transl Med* 2023;12:474–84.
- [23] Lee CCI, Christensen JE, Yoder MC, Tarantal AF. Clonal analysis and hierarchy of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells. *Exp Hematol* 2010;38:46–54.
- [24] Forman HJ, Maiorino M, Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 2010;49:835–42.
- [25] Denu RA, Hematti P. Effects of oxidative stress on mesenchymal stem cell biology. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:2989076.
- [26] Choo KB, Tai L, Hymavathie KS, Wong CY, Nguyen PNN, Huang C-J, et al. Oxidative stress-induced premature senescence in Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci* 2014;11:1201–7.
- [27] Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh’s model. *Biophys J* 2001;81:675–84.
- [28] Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J* 2001;81:685–96.
- [29] Hu X, Wei L, Taylor TM, Wei J, Zhou X, Wang J-A, et al. Hypoxic preconditioning enhances bone marrow mesenchymal stem cell migration via Kv2.1 channel and FAK activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;301:C362–72.
- [30] Wei N, Yu SP, Gu X, Taylor TM, Song D, Liu X-F, et al. Delayed intranasal delivery of hypoxic-preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhanced cell homing and therapeutic benefits after ischemic stroke in mice. *Cell Transplant* 2013;22:977–91.
- [31] Feng Y, Huang W, Wani M, Yu X, Ashraf M. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22. *PLoS One* 2014;9:e88685.
- [32] Wang J, He A, Hu X, Jiang Y, Sun Y, Jiang J, et al. Anoxic preconditioning: a way to enhance the cardioprotection of mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol* 2009;133:410–2.
- [33] Peng X, Liang B, Wang H, Hou J, Yuan Q. Hypoxia pretreatment improves the therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in hindlimb ischemia via upregulation of NRG-1. *Cell Tissue Res* 2022;388:105–16.
- [34] Sandvig I, Gadjanski I, Vlaski-Lafarge M, Buzanska L, Loncaric D, Sarnowska A, et al. Strategies to enhance implantation and survival of stem cells after their injection in ischemic neural tissue. *Stem Cells Dev* 2017;26:554–65.
- [35] Loncaric D, Rodriguez L, Debeissat C, Touya N, Labat V, Villacreses A, et al. α -tocopherol acetate attenuates mitochondrial oxygen consumption and maintains primitive cells within mesenchymal stromal cell population. *Stem Cell Rev* 2021;17:1390–405.

- [36] Wu M, Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, Parslow D, et al. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C125–36.
- [37] Pike Winer LS, Wu M. Rapid analysis of glycolytic and oxidative substrate flux of cancer cells in a microplate. *PLoS One* 2014;9:e109916.
- [38] Vlaski-Lafarge M, Loncaric D, Perez L, Labat V, Debeissat C, Brunet de la Grange P, et al. Bioenergetic changes underline plasticity of murine embryonic stem cells. *Stem Cells* 2019;37:463–75.
- [39] Jang Y-Y, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* 2007;110:3056–63.
- [40] Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417:1–13.
- [41] Rojewski MT, Weber BM, Schrezenmeier H. Phenotypic characterization of mesenchymal stem cells from various tissues. *Transfus Med Hemother* 2008;35:168–84.
- [42] Skovronova R, Grange C, Dimuccio V, Deregibus MC, Camussi G, Bussolati B. Surface marker expression in small and medium/large mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles in naive or apoptotic condition using orthogonal techniques. *Cells* 2021;10:2948.
- [43] Pacini S, Petrini M. Editorial: in search of in vivo MSC. *Front Cell Dev Biol* 2017;5:60.
- [44] Zhou L, Sheng D, Wang D, Ma W, Deng Q, Deng L, et al. Identification of cancer-type specific expression patterns for active aldehyde dehydrogenase (ALDH) isoforms in ALDEFLUOR assay. *Cell Biol Toxicol* 2019;35:161–77.
- [45] Singh S, Brocker C, Koppaka V, Chen Y, Jackson BC, Matsumoto A, et al. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic Biol Med* 2013;56:89–101.
- [46] Ng THS, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol* 2013;4:129.
- [47] Wang L, Shi S, Bai R, Wang Y, Guo Z, Li D. Biological properties of bone marrow stem cells and adipose-derived stem cells derived from T2DM rats: a comparative study. *Cell Biosci* 2020;10:102.
- [48] Abd-Elhalem SS, Haggag NZ, El-Shinnawy NA. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress IL-9 in adjuvant-induced arthritis. *Autoimmunity* 2018;51:25–34.
- [49] Miossec P. Local and systemic effects of IL-17 in joint inflammation: a historical perspective from discovery to targeting. *Cell Mol Immunol* 2021;18:860–5.
- [50] Krstic A, Mojsilovic S, Jovcic G, Bugarski D. The potential of interleukin-17 to mediate hematopoietic response. *Immunol Res* 2012;52:34–41.
- [51] Huang H, Kim HJ, Chang E-J, Lee ZH, Hwang SJ, Kim H-M, et al. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. *Cell Death Differ* 2009;16:1332–43.
- [52] Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S. Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 2002;3:1156–62.
- [53] Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* 2007;89:205–12.
- [54] Simpson RJ, Jensen SS, Lim JWE. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* 2008;8:4083–99.
- [55] Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using nanoparticle tracking analysis. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2011;7:780–8.
- [56] Sokolova V, Ludwig A-K, Hornung S, Rotan O, Horn PA, Epple M, et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011;87:146–50.
- [57] Almeria C, Weiss R, Roy M, Tripisciano C, Kasper C, Weber V, et al. Hypoxia conditioned mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles induce increased vascular tube formation in vitro. *Front Bioeng Biotechnol* 2019;7:292.
- [58] Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol* 2011;12:12.
- [59] EjtehadiFar M, Shamsasenjan K, Movassaghpour A, AkbarzadehLaleh P, Dehdilani N, Abbasi P, et al. The effect of hypoxia on mesenchymal stem cell biology. *Adv Pharm Bull* 2015;5:141–9.
- [60] Estrada JC, Albo C, Benguría A, Dopazo A, López-Romero P, Carrera-Quintanar L, et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ* 2012;19:743–55.



Normal Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Can Exhibit Metabolic Flexibility Similar to Cancer Cells

Marija Vlaski-Lafarge^{1,2*}, *Veronique Labat*^{1,2}, *Alexandra Brandy*^{1,2}, *Alice Refeyton*^{1,2}, *Pascale Duchez*^{1,2}, *Laura Rodriguez*^{1,2}, *Nyere Gibson*¹, *Philippe Brunet de la Grange*^{1,2} and *Zoran Ivanovic*^{1,2}

¹ R&D Department, Etablissement Français du Sang Nouvelle Aquitaine, Bordeaux, France, ² Inserm/U1035, University of Bordeaux, Bordeaux, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Tuuli Käämbre,
National Institute of Chemical Physics
and Biophysics, Estonia

Reviewed by:

Stephen John Ralph,
Griffith University, Australia
Amilcare Barca,
University of Salento, Italy

*Correspondence:

Marija Vlaski-Lafarge
marija.vlaski@efs.sante.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 29 February 2020

Accepted: 15 April 2020

Published: 12 May 2020

Citation:

Vlaski-Lafarge M, Labat V, Brandy A, Refeyton A, Duchez P, Rodriguez L, Gibson N, Brunet de la Grange P and Ivanovic Z (2020) Normal Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Can Exhibit Metabolic Flexibility Similar to Cancer Cells. *Front. Oncol.* 10:713. doi: 10.3389/fonc.2020.00713

It is known that cancer stem cells (CSCs) with the largest proliferative capacity survive the anoxic and/or ischemic conditions present inside tumorous tissue. In this study we test whether normal stem cells can survive under the same conditions due to cancer cell-like metabolic adaptations. We cultivated a CD34⁺ population with a majority of hematopoietic progenitors, and a CD34⁺CD38^{low}CD133⁺CD90⁺CD45RA⁻ population, highly enriched in hematopoietic stem cells (HSCs), under anoxic, anoxic/aglycemic (“ischemia-like”), or physiological conditions (3% O₂). Results showed, despite a reduction in total cell fold expansion proportionate to the decrease in O₂ concentration; CD34⁺ cells, aldehyde dehydrogenase-expressing primitive cells, and committed progenitors expanded, even in anoxia. Interestingly, under ischemia-like conditions, stem and CD34⁺ cell populations are maintained at day-0 level. Cell-cycle analysis further revealed an accumulation of cells in the G0/G1 phase in anoxia or anoxia/aglycemia, with a fraction of cells (~40%) actively cycling (SG2M phases). Also stem cell analysis showed that in these conditions a long-term Scid Repopulating activity was equal to that found with 3% O₂. In addition stem cells with the highest proliferative capacity were maintained in anoxia/aglycemia and in anoxia. The estimated ATP profile, active mitochondrial content, and succinate accumulation are indicative of anaerobic mitochondrial respiration in both HSCs and CD34⁺ progenitors under ischemia-like conditions. We demonstrate here that primitive hematopoietic cells show similar metabolic flexibility to CSCs, allowing them to survive a lack of O₂ and O₂/glucose. Our study reveals that this feature is not the consequence of malignant transformation, but an attribute of stemness.

Keywords: cancer stem cells, hematopoietic stem cells, metabolism, bioenergetics, mitochondrial respiration

INTRODUCTION

The concept of cancer stem cells (CSCs) is well-established (1). CSCs display functions similar to normal stem cells, including self-renewal, differentiation potential, migration, a high proportion of cells in G0 phase, and drug resistance. Also, as normal stem cells, CSCs represent the small fraction of tumor cell population capable of self-regeneration as well as of propagation of the malignant cell

population giving rise to new tumors in tissues other than those from which the cancer originates (2).

In addition, functional, normal, and CSCs share several metabolic traits. Cancer cells show flexible, metabolic reprogramming phenotypes which use an array of energetic fuels to enable survival, and proliferation under various conditions (3, 4). Proliferating tumor cells tend toward a glycolytic metabolism, even under aerobic conditions, in order to acquire the precursors necessary for increased biosynthesis (5). This high demand for glycolysis occurs without loss of mitochondrial activity (TCA cycle/respiration) (6). It should be stressed that, contrary to common assumption, the Warburg effect is not in fact specific to malignancy (2). A glycolytic metabolic profile has been shown to be an intrinsic property of hematopoietic stem cells (HSCs), related to stemness, enabling the cells to reside in areas with extremely low O₂ (hematopoietic niche). But this metabolic profile is also maintained when HSCs are outside of the physiological niche (2). Indeed, HSCs from bone marrow or mobilized in peripheral blood exhibit a glycolytic metabolic profile even when cultured under non-physiologically high atmospheric air O₂ concentrations (7, 8).

However, both HSCs and cancer cells possess active mitochondria that contribute to their maintenance, and retain the ability for oxidative phosphorylation (6, 9). Besides their role in energy production, mitochondria also play a role in recycling NAD⁺ and maintaining the glycolytic flow, generating intermediates for anabolic pathways, epigenetic control, and protection against oxidative stress. They also have the ability to change swiftly to OXPHOS in order to meet the high energy demands linked to differentiation toward mature somatic cells (10).

In cancer cells, targeted depletion of mitochondrial DNA reduces the tumorigenic potential of cancer cells *in vitro* and *in vivo* (11, 12). Also, quiescent and circulating cancer cells rely highly on mitochondrial respiration (11, 13). The tumorous cells' metabolic flexibility between a predominantly biosynthetic or bioenergetic purpose is a result of this apparent dichotomy (glycolysis/mitochondrial respiration). Recent data show that the cancer cells with the greatest stem cell potential are responsible for the durability of the disease and can survive under severe conditions, such as anoxia and/or ischemia, created inside the tumor tissue. This ability to survive also depends on the metabolic consequences of anaerobic mitochondrial respiration. The mechanism described includes the use of fumarate as the final electron acceptor (fumarate respiration or "disproportionation of malate") (14).

We thus want to test the hypothesis that HSCs, unlike mature cells, can survive under extreme conditions (anoxia and

ischemia-like) due to metabolic adaptation, including anaerobic mitochondrial activity.

Our study, based on functional and metabolic analysis of HSCs, points to flexible energetic nature and high metabolic adaptability as being features common to stem cells, rather than specific to CSCs.

MATERIALS AND METHODS

Cell Sorting and Culture

CD34⁺ Cell Isolation

Cord blood (CB) samples delivered (with the mother's approval) to the Cell Therapy Unit of the French Blood Institute, Bordeaux, that had been rejected for banking, were used for the experiments (In compliance with national French regulation, declared to the Ministry of Research: DC-2019-3720). CB CD34⁺ cells were isolated using an immunomagnetic technique (Miltenyi Biotec, Paris, France) and stored at -80°C (15).

CD34⁺CD38^{low}CD133⁺CD90⁺CD45RA⁻ Cell Sorting

CD34⁺ cells were thawed in 4% human serum albumin (Vialebex, LFB-biomedicament, Courtabeuf, France) and labeled with anti-CD34-BV421 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), anti-CD38-PC7, anti-CD133-PE (EXBIO, Vestec, Czech Republic), anti-CD90-APC, and anti-CD45RA-FITC antibodies (Pharmigen, San Diego, CA, USA). The desired cell population was selected using a FACS Aria III cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) (16).

Cell Culture

CD34⁺ or CD34⁺CD38^{low}CD133⁺CD90⁺CD45RA⁻ cells were plated in Stem-alpha A medium without glucose (Stem Alpha SA, Saint-Genis-l'Argentiere, France), supplemented with penicillin/streptomycin (PS) (100 ng/L), and cytokines: SCF 100 ng/mL, IL-3 0.5 ng/mL, TPO 10 ng/mL. Cells were incubated under physiological conditions (3% O₂, with glucose 1 g/L), anoxia (0% O₂, with glucose 1 g/L), or anoxia/aglycemia (AA, 0% O₂, without glucose) for 5–7 days at 37°C. The conditions with 3% O₂ were obtained in an O₂ and CO₂ controller-culture chamber (PRO-OX and PRO-CO₂, Biospherix, NY) (15). Anoxia was achieved using a hermetically sealed modular incubator chamber (Billups-Rothenberg, CA) in which ambient air was replaced with a mixture of 95% nitrogen and 5% CO₂ (Air Liquide, Paris, France). At the end of the incubation period, cell expansion was estimated by cell counting.

Apoptosis Assay

Apoptosis was detected with an Annexin V-FITC kit (Beckman Coulter, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 10⁵ cells from each of the experimental conditions were stained with Annexin V-FITC solution (AnnV) and propidium iodide (PI, 250 µg/mL) for 15 min at 4°C in the dark, washed in phosphate buffer saline (PBS), and analyzed with a flow cytometer (BD Bioscience, FACS Canto II) (17). This technique allow to detect: unlabelled viable cell subpopulation (AnnV⁻/PI⁻); early apoptotic cell subpopulation that have

Abbreviations: AA, anoxia/aglycemia; ALDH, aldehyde dehydrogenase; Ann/PI, annexin/propidium iodide; ATP, adenosine triphosphate; CB, cord blood; CFC, colony forming cell; CSCs, cancer stem cells; IL-3, interleukin-3; HPCs, hematopoietic progenitor cells; HSCs, hematopoietic stem cells; MFI, Mean fluorescence intensity; MTG, Mitotracker green; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; SCE, stem cell factor; TCA, cycle-tricarboxylic acid cycle; TPO, thrombopoietin.

bound only AnnV (Ann⁺/PI⁻); necrotic cell subpopulation (representing the cells in post-apoptosis necrosis or late apoptosis) that have both bound AnnV and have been labeled with PI (Ann⁺/PI⁺).

Cell Cycle Analysis

For cell cycle analysis, 10⁵ cells were washed with PBS, centrifuged at 43 g for 5 min at 4°C, and the pellets were resuspended in 100 µl of PBS. Cells were then fixed with 900 µl of 70% cold ethanol (added dropwise), and incubated for 1 h at 4°C. Cells were washed and resuspended in PBS with 0.2 mg/mL of bovine RNase A and incubated for 1 h at 37°C in the dark. PI (10 µg/mL) was added, and the analysis was performed using flow cytometry (Bioscience, FACS Canto II) (17). The percentage of cells in each of the different cell cycle phases (G0/G1, S, and G2/M) was calculated from the linear graph on which cell counts were plotted relative to cell DNA content. The reagents were provided by Sigma Aldrich.

CFC Assay

The committed hematopoietic progenitors' colony-forming cell (CFC), including colony-forming unit granulocyte, monocyte (CFU-GM), burst-forming unit erythroid (BFU-E), colony-forming unit granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte (CFU-GEMM) were assayed as described previously (18). Cells (250 cells/mL) were seeded in cytokine-supplemented methylcellulose in a 24-well-plate (MethoCult H4034 Optimum, Stem Cell Technologies, Canada). After 15 days of incubation, CFCs were counted using an inverted microscope.

Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Activity

ALDH labeling was undertaken using an Aldefluor reagent (ALDF) (Stem Cell Technologies, Canada) according to the manufacturer's instructions. Activated ALDF substrate was rapidly added to a suspension of 10⁵ cells in 100 µL of ALDF assay buffer and incubated for 30 min at 37°C in the dark. As a negative control, an aliquot of ALDF-stained cells was incubated with the ALDH inhibitor diethylaminobenzaldehyde. Cells were washed, resuspended in 200 µL of assay buffer, and analyzed with a flow cytometer (BD Bioscience, FACS Canto II) (15).

Proliferative, Clonogenic, and Differentiation Potential Evaluation by the Single-Cell Culture Method

The method was performed as it was previously published (16, 19).

Proliferative Capacity

Single cells selected from each of the experimental conditions were assayed into individual wells of 96-well-plates. Each well contained 200 µl of the Stem alpha A medium, supplemented with glucose (1 g/l) and cytokines (see above). Plates were incubated at 20% O₂ and 5% CO₂ for 14 days at 37°C. The entire cell content produced in the primary culture from one individual cell was reseeded into 24-well-plates under the same culture conditions. Secondary culture cell content was re-evaluated at Day-28. Clone categories were established according to the

number of cells produced: (C1 = 0; C2 = 1,000–4,000; C3 = 5,000–10,000; C4 = 13,500–14,000; C5 = 15,000–15,500 cells).

Clonogenic Capacity

Methylcellulose colony formation was assessed by sorting single cells from the different experimental conditions into individual wells of a 96-well-plate, containing 100 µl of methylcellulose (MethoCult H4034). The plates were incubated at 20% O₂ and 5% CO₂ for 15 days at 37°C. The colonies from the committed progenitors were then counted. Each colony was harvested, and replated into an individual well of a 24-well-plate containing methylcellulose (250 µl). The plates were incubated for 14 days at 37°C secondary colony formation was then assessed.

Differentiation Potential

For *in vitro* differentiation assays, cells from each of the experimental conditions were incubated for 14 days in the same manner as described for the proliferative capacity analysis. 24-well-plates had been seeded with murine stromal cells (MS5) in a αMEM medium (Gibco, Thermo Fisher, Langensfeld, Germany) with 10% fetal calf serum and PS (100 ng/L). At the end of the incubation period in liquid culture, hematopoietic cells were co-cultivated on MS5 for 30 days with a complete RPMI medium (Thermo Fisher, Langensfeld, Germany, with SCF 100 ng/mL, IL-3 0.5 ng/mL, G-CSF 100 ng/mL, TPO 10 ng/mL, 10% fetal calf serum, and PS) at 37°C. At the end of the incubation period, hematopoietic cells from each well were harvested and labeled at 4°C for 20 min in the dark with anti-CD19-PE, anti-CD33-APC (BD, Biosciences, San Diego, CA, USA), and anti-CD45-FITC antibodies (IOTest, Beckman Coulter, Carlsbad, CA, USA), and analyzed with a flow cytometer.

Scid Repopulating Cells (SRC) Assay

All experiments involving animals were performed in compliance with French regulation (License No: 3306002). From each of the experimental conditions, the equivalent of 300 Day-0 CD34⁺CD38^{low}CD133⁺CD90⁺CD45RA⁻ cells at Day-7 were injected into the retro-orbital vein of 6–10-week-old NOD-Shi-Scid/IL-2Rgnull (NOG) mice (animal-keeping facility, University of Bordeaux, France). The mice had been prepared using an intraperitoneal injection of Busulfan 25 mg/kg (Busilvex, Pierre Fabre, Boulogne, France) (20). Positive control mice (injected with 300 Day-0 CD34⁺CD38^{low}CD133⁺CD90⁺CD45RA⁻ cells) and negative control mice (non-injected) were included. After 12 weeks, animals were euthanized and their femora were extracted. The femoral bone marrow was flushed with 1 ml of RPMI medium (Gibco, Thermo Fisher, Langensfeld, Germany) supplemented with 4% human serum albumin. The cells contained in 100 µl of this cell suspension were stained with anti-human antibodies: CD45-FITC, CD19-PE, and CD33-APC, for 20 min at 4°C in the dark, washed with PBS and analyzed on a FACS Canto II (21). The positivity threshold for human CD45, CD33, CD19 chimerism was >0.1% of analyzed cells.

ATP Content

ATP levels were quantified using the ATP Bioluminescence Assay Kit HS II kit (Roche, Switzerland) in accordance with the

manufacturer's recommendations, as it was previously published (15). A total of 10^3 cells per well were used in a 96-well-plate. Luminescence, directly proportional to the concentration of ATP, was detected using a luminometer at $\alpha = 562$ nm (Promega GloMax). In order to determine the total cellular and mitochondrial ATP production, cells were incubated for 10 min in the absence of or in the presence of inhibitors of the mitochondrial complexes I and III, rotenone, and antimycin (1 μ M), respectively. These inhibitors were added simultaneously in order to curb electron flow through the mitochondrial electron transport chain, and so prevent generation of the proton motive force enabling ATP production by ATP synthase. The proportion of cellular ATP produced by mitochondria was calculated using the decrease in total ATP detected in the presence of these inhibitors.

Mitochondrial Content

Mitochondria were detected using mitochondrial-selective fluorescent labeling with MitoTracker Green, according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes). A total of 10^4 cells were treated with Mitotracker green (100 nM) for 20 min at 37°C in the dark, then washed in PBS and analyzed using flow cytometry as previously published (17).

Succinate Content

The succinate that had accumulated during cell culture was detected in the culture supernatant at the end of the incubation period according to the manufacturer's instructions (Succinate assay kit, Abcam, UK). Cell suspensions were harvested, washed and resuspended in 100 μ l of ice-cold succinate assay buffer. The suspensions were centrifuged, and the collected supernatants were filtered using a 10 kDa spin filter. Fifty microliter of each sample or standard dilution were mixed with the same volume of the reaction mix or background control mix and incubated for 30 min at 37°C. The absorbance intensity was measured at 450 nm using a microplate reader (Evolis, Biorad). Each value was adjusted with the background control, in order to eliminate any non-specific absorbance that may have resulted from the possible presence of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). Succinate concentration was then determined based on the standard curve.

Statistical Analysis

The Wilcoxon-Mann-Whitney paired comparison test was used to examine the significance of the difference between the various experimental conditions ($p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$ were considered to be statistically significant).

RESULTS

Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Survival in the Anoxia and AA

In order to test our hypothesis that primitive hematopoietic cells can survive under conditions commonly found in tumor tissue, we assayed both a total CD34⁺ population (CD34⁺) with a majority of hematopoietic progenitors (HPCs) and a rare minority of stem cells and a selected

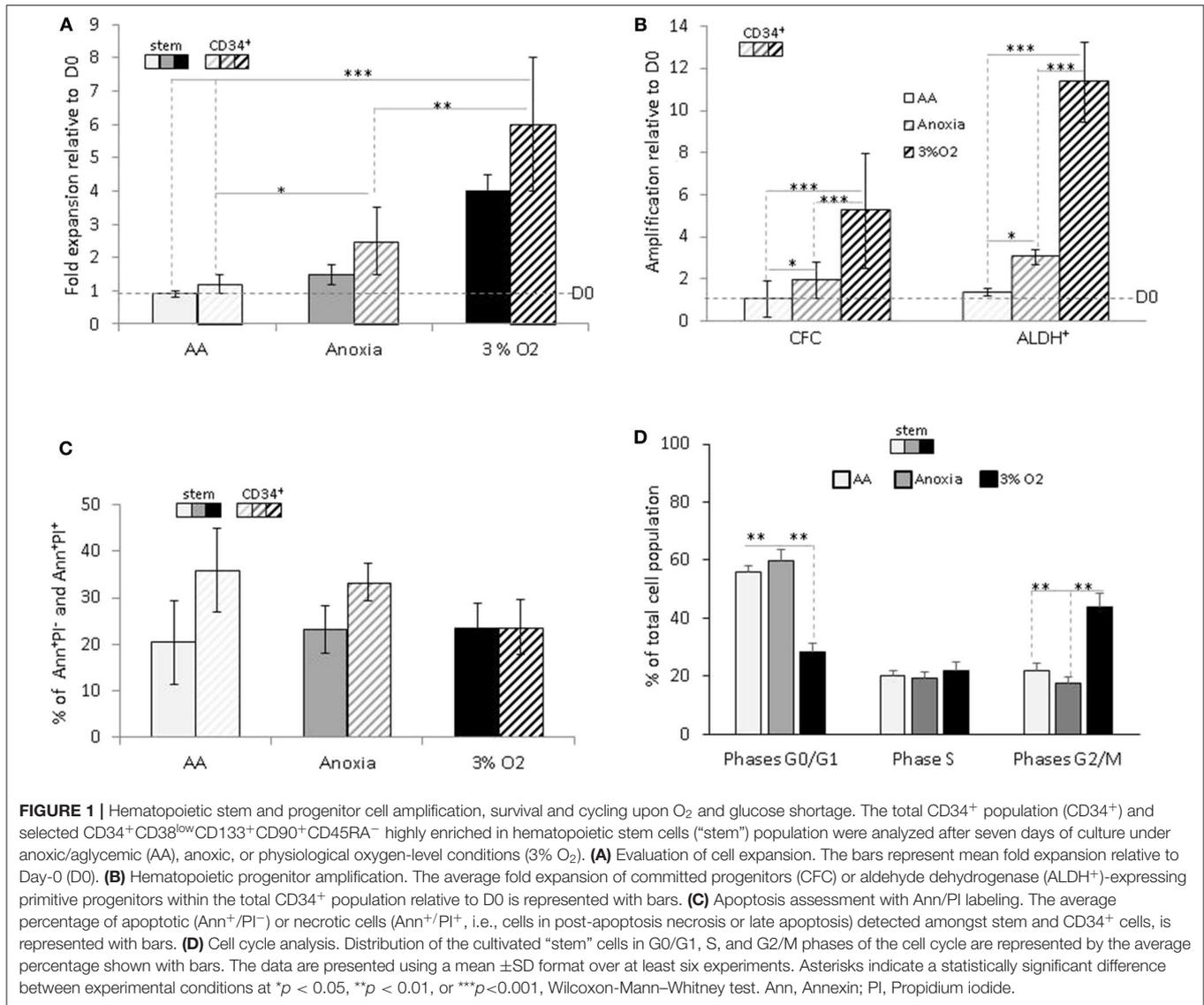
CD34⁺CD38^{low}CD133⁺CD90⁺CD45RA⁻ population highly enriched in hematopoietic stem cells (HSCs, "stem") under anoxic, anoxic/aglycemic (ischemia like, "AA"), or physiological conditions (3% O₂) for seven days.

Based on the difference in cell numbers between Day-0 and post-incubation, the results showed that the entire cell population survived under AA conditions, in both the stem and CD34⁺ total population, with slight expansion in anoxia (Figure 1A). We decided to investigate whether this property was associated with the functional characteristics of hematopoietic cells within the heterogeneous CD34⁺ population. Primitive hematopoietic cells expressing ALDH, as well as committed progenitors incubated in anoxia, yielded a significant level of amplification compared to Day-0. The maintenance in number of both cell populations under AA conditions is indicative of metabolic adaptation to glucose and O₂ shortage (Figure 1B). As expected, these conditions yielded a significantly lower number of cells than physiological conditions (3% O₂), which allow optimal cell expansion (Figures 1A,B). Cellular viability was estimated using Annexin V/Propidium iodide labeling (Ann/PI). Similar percentage of apoptotic cells (including the subpopulation expressing Ann⁺/PI⁻) or necrotic cells (subpopulation expressing Ann⁺/PI⁺) was detected in both stem and CD34⁺ cells, under all conditions (Figure 1C). We further analyzed the cell cycle phase distribution with PI staining (Figure 1D). When incubated under restricted conditions, there was a significant accumulation of cells in the non-dividing G0/G1 phase of the cell cycle, compared to physiological conditions. However, a fraction (~40%) of the cell population was still actively proliferating (S and G2/M phases) in AA and anoxia (Figure 1D). This distribution could be responsible for the cultures' maintenance and/or slight expansion in the absence of O₂ with/without glucose, allowing for a ~20% apoptosis rate. The observed survival of primitive hematopoietic cells, irrespective of the conditions (anoxia, AA) indicates their flexible metabolic nature.

Stem Cell Functions Are Maintained *in vitro* in Anoxia and AA

The population enriched in stem cells was analyzed by single cell assay in order to detect stem cell traits—self-renewal, proliferation, and multipotency—*in vitro* at an individual cell level.

In order to estimate the cell's proliferative capacity, we counted the number of cells produced in a secondary culture, having replated the cells descending from a single cell (seeded in a primary liquid culture) (Figure 2A). This secondary culture allowed us to detect both the total number of cells per well—total progeny of the initial single cell—and the proportion of clones produced by CD34⁺ cells in the primary culture. They were then sorted into five categories (see above, Material and methods). The more primitive the cell, the greater its progeny in the secondary culture, due to a higher proliferative potential. Our results showed that the cells producing the most proliferative clones (categories 4 and 5) were present only under AA conditions (Figure 2A). Using an approach based on



methylcellulose culture, we found that the number of individual cells giving primary colonies (plating efficiency) was the highest under AA conditions (Figure 2B, Primary colonies). All cells from the individual cell-derived colonies (each primary culture well) were harvested, dissociated, and plated in individual wells in the secondary methylcellulose culture in order to assess replating efficiency (*in vitro* surrogate for “self-renewal”). Secondary colonies only grew from those primary colonies which contained self-renewed primitive progenitors. Replating efficiency was observed under all conditions, but the highest proportion of initially seeded single cells able to produce colonies in secondary culture was detected under AA conditions (Figure 2B, Secondary colonies). We then tested if these primary colonies could undergo myeloid or lymphoid lineage differentiation on a mesenchymal stroma layer, proving their multipotency. For this, we ascertained the percentage of human CD45⁺ cells (a pan-hematopoietic cell marker) expressing markers of the myeloid (CD33⁺) or lymphoid (CD19⁺) lineage differentiation. The

proportions detected were equal under all culture conditions (Supplementary Figure 1). The results indicate that the basic stem cell functions of self-renewal and multipotency are not comprised by incubation in anoxia or AA.

Long-Term *in vivo* Hematopoietic Reconstitution Upon Transplantation of the Cells Cultivated in Anoxia and AA

When assaying stem cells, the most effective method is to track their ability to reconstitute haematopoiesis in immunosuppressed mice 12–16 weeks after transplantation (22, 23). We analyzed the presence of the human cell marker CD45 12 weeks after xeno-transplantation of NOG mice. We found significant human cell engraftment in the mice’s bone marrow (Figure 3, upper panel). Graft efficiency was defined as the number of mice testing positive for human CD45⁺ cells relative to the total number of mice injected.

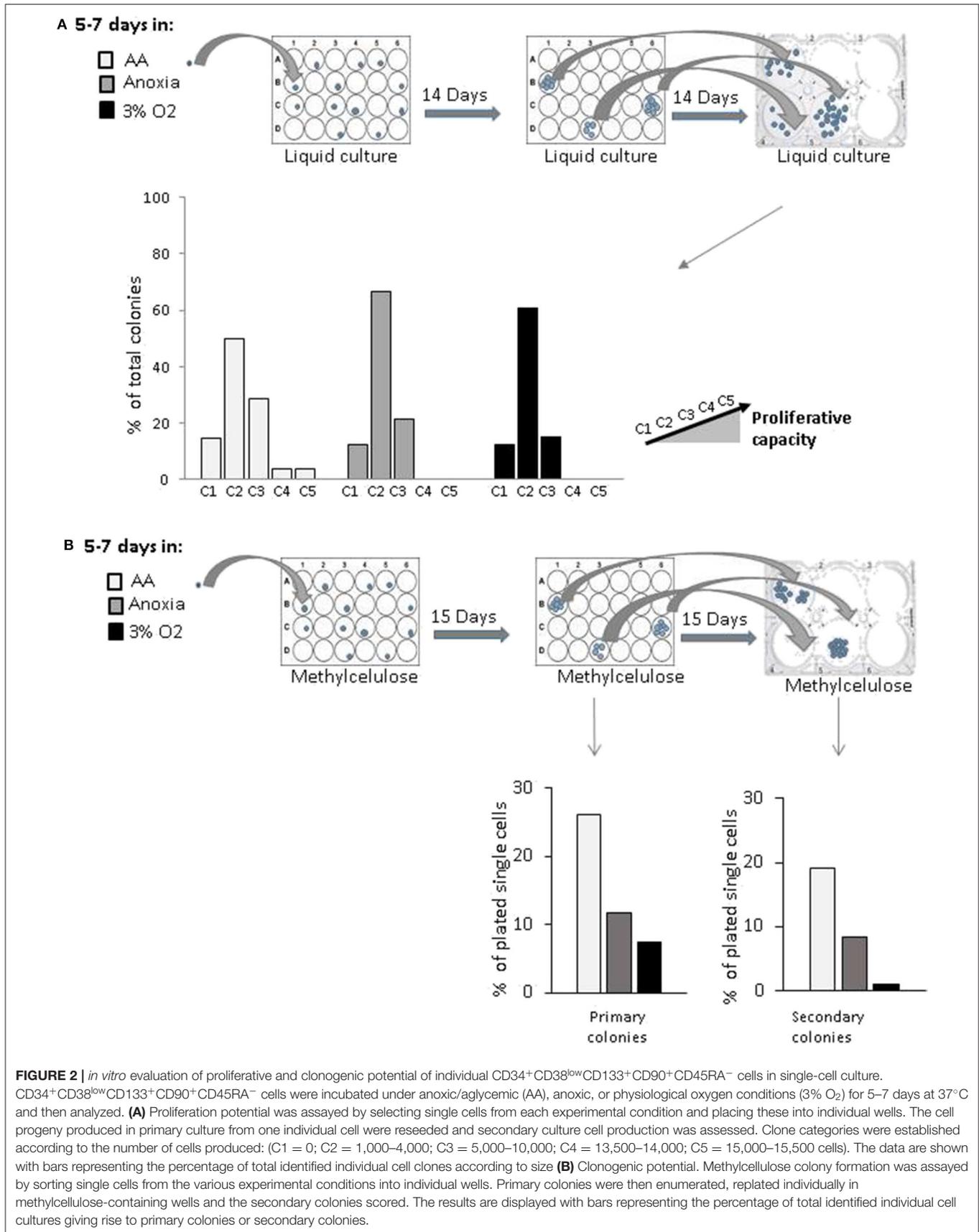
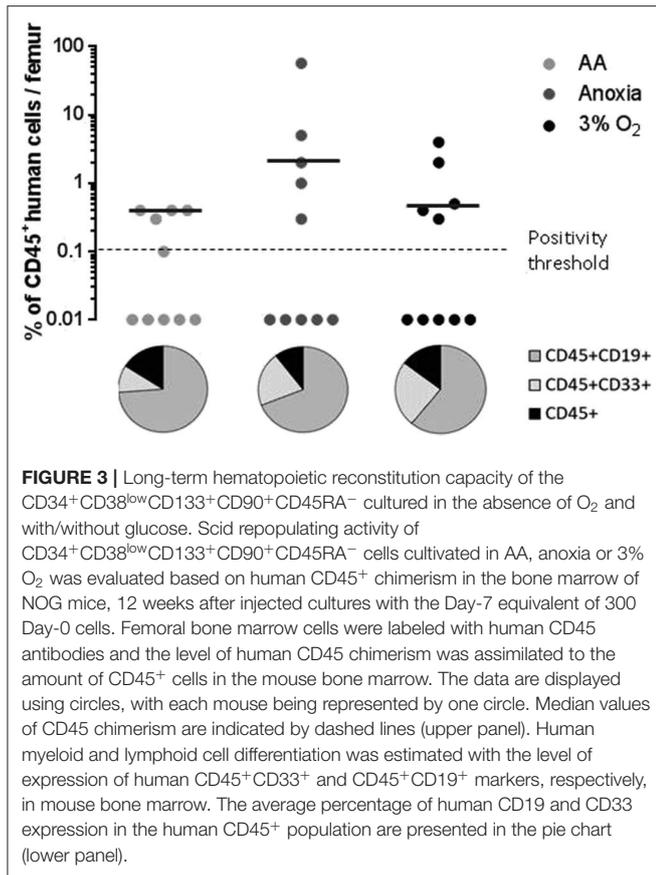


FIGURE 2 | *in vitro* evaluation of proliferative and clonogenic potential of individual CD34⁺CD38^{low}CD133⁺CD90⁺CD45RA⁻ cells in single-cell culture. CD34⁺CD38^{low}CD133⁺CD90⁺CD45RA⁻ cells were incubated under anoxic/aglycemic (AA), anoxic, or physiological oxygen conditions (3% O₂) for 5–7 days at 37°C and then analyzed. **(A)** Proliferation potential was assayed by selecting single cells from each experimental condition and placing these into individual wells. The cell progeny produced in primary culture from one individual cell were reseeded and secondary culture cell production was assessed. Clone categories were established according to the number of cells produced: (C1 = 0; C2 = 1,000–4,000; C3 = 5,000–10,000; C4 = 13,500–14,000; C5 = 15,000–15,500 cells). The data are shown with bars representing the percentage of total identified individual cell clones according to size **(B)** Clonogenic potential. Methylcellulose colony formation was assayed by sorting single cells from the various experimental conditions into individual wells. Primary colonies were then enumerated, replated individually in methylcellulose-containing wells and the secondary colonies scored. The results are displayed with bars representing the percentage of total identified individual cell cultures giving rise to primary colonies or secondary colonies.



This ratio was equal for all experimental conditions (Figure 3, upper panel). The mean percentage of CD45⁺ cells—level of CD45 chimerism—was consistent in AA and anoxia as well as under physiological conditions. These results indicate a long-term ability maintained by the stem cell population, throughout incubation, for hematopoietic reconstruction, a trait attributable to the most primitive HSCs. CD45⁺CD33⁺ and CD45⁺CD19⁺ markers were then used to detect human myeloid or lymphoid differentiation, respectively (Figure 3, pie chart). This property was again detected under all conditions. The ratio of CD45⁺CD33⁺ to CD45⁺CD19⁺ cell subpopulations indicated that cells incubated in AA tend toward lymphoid lineage more than in anoxia and 3% O₂ (Figure 3, pie chart).

ATP Production, Active Mitochondrial, and Succinate Content in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Anoxia and AA

In order to reveal the specific bioenergetic profile enabling hematopoietic cell survival without O₂ or glucose, we analyzed the cellular ATP content (Figure 4A). Firstly, this showed a significant decrease in the total level of ATP in anoxia and AA compared to 3% O₂, indicating a decrease in cellular ATP production. After simultaneous introduction of inhibitors of mitochondrial complexes I and III (rotenone and antimycin, respectively), the decrease in total ATP indicated the fraction

of ATP produced by mitochondria. We found that most of the ATP in AA is produced by mitochondria; apart from the observation that anaerobic mitochondrial ATP production is active in AA, the simultaneous addition of inhibitors prevented us from distinguishing the specific effect of either complex (Figure 4A). This phenomenon was observed in both the stem and total CD34⁺ cell populations. To see whether these changes were associated with a difference in mitochondrial mass content, we labeled the cells with Mitotracker green at the end of the incubation period. This is a compound which binds to active polarized mitochondria, indicating cellular mitochondrial mass (24). We found a similar quantity of active mitochondria per cell under all conditions, amongst stem cells as well as the total CD34⁺ population (Figure 4B). This would suggest that mitochondrial content was not affected by the absence of O₂ or glucose. Furthermore, compared to HSCs, the mitochondrial content in CD34⁺ cells was significantly higher under all conditions, indicating that in terms of bioenergetics, progenitor cells are more dependent on mitochondrial respiration than stem cells (Figure 4B).

In a recent publication, Tomitsuka et al. described how cancer cells can survive in ischemia where anaerobic mitochondrial fumarate respiration is activated (25). Using this fumarate as the final electron acceptor, then it is reduced into succinate that accumulates during culture. To test if, under our AA conditions, anaerobic mitochondrial respiration works in the same manner as in cancer cells, we measured the level of succinate in culture supernatants. The results show that the succinate content in AA supernatant is significantly higher compared to 3% O₂ and anoxia (Figure 4C). These results point clearly to succinate accumulation under ischemia-like conditions and suggest the activation of fumarate respiration as an energetic pathway in HSCs/HPCs under these circumstances. Interestingly, this was detected in stem and CD34⁺ cells, indicating that HSCs as well HPCs can exhibit metabolic adaptations to survive in ischemia-like conditions and activate anaerobic mitochondrial respiration.

DISCUSSION

Our study demonstrates that HSCs/HPCs are capable of maintaining their functional traits, high proliferative capacity, and multipotency in the absence of O₂ and/or glucose. Although cell numbers were significantly reduced in comparison with physiological conditions, a significant fraction of surviving cells was actively cycling independent of O₂ and/or glucose omission (Figure 1). Moreover, primitive CB progenitors and stem cells (ALDH⁺), as well as committed progenitors, were even seen to multiply despite the absence of O₂, indicating an oxygen-independent mechanism, which is arrested by glucose shortage. This is consistent with data showing a link between glucose import and cell proliferation in normal as well as cancer cells, in order to provide the carbon intermediates for biosynthesis (4, 26).

Using our method, the greatest capacity to adapt was detected in the stem cell population, wherein SRC (Scid repopulating cell) activity was equivalent to that which was detected under

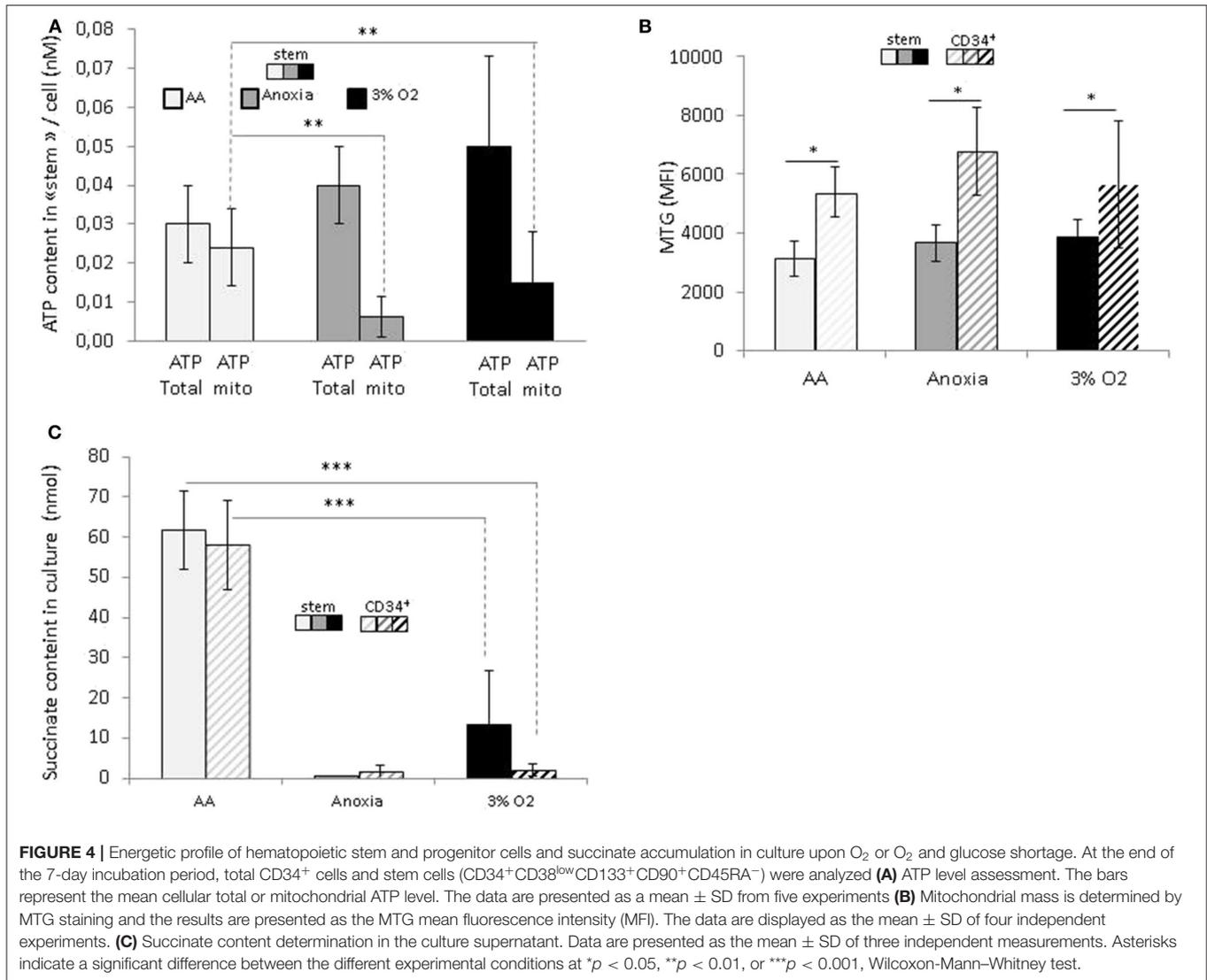


FIGURE 4 | Energetic profile of hematopoietic stem and progenitor cells and succinate accumulation in culture upon O₂ or O₂ and glucose shortage. At the end of the 7-day incubation period, total CD34⁺ cells and stem cells (CD34⁺CD38^{low}CD133⁺CD90⁺CD45RA⁻) were analyzed (A) ATP level assessment. The bars represent the mean cellular total or mitochondrial ATP level. The data are presented as a mean ± SD from five experiments (B) Mitochondrial mass is determined by MTG staining and the results are presented as the MTG mean fluorescence intensity (MFI). The data are displayed as the mean ± SD of four independent experiments. (C) Succinate content determination in the culture supernatant. Data are presented as the mean ± SD of three independent measurements. Asterisks indicate a significant difference between the different experimental conditions at *p < 0.05, **p < 0.01, or ***p < 0.001, Wilcoxon-Mann-Whitney test.

optimal physiological conditions (Figure 3). Notably, under ischemia-like conditions, we identified the cell subpopulation with the highest proliferative capacity, indicating an association between high metabolic robustness and the most primitive of cells.

Various articles describe how O₂ is a functional regulator of HSCs/HPCs. Our results are consistent with and could indeed extend, those showing that although low O₂ concentration, close to that found in bone marrow stem cell niches (0.1%), induced the return of half of the CB CD34⁺ cells or murine hematopoietic progenitor non-leukemic factor-dependant cell Paternsen (FDCP) mix-cell line to G0 phase, it also selected the small proportion of self-renewing cells in the proliferating phase of cycle, without impairing their functional capacity, SRC activity, or clonogenicity (27, 28). Further, a 1% O₂ concentration enables HSC enrichment as well as primitive erythroid progenitors within CB CD34⁺ cell population (29–31). In addition, our study confirmed that well-adapted physiologically-relevant low O₂ concentration (3%) allows

simultaneous HSC maintenance and committed progenitor expansion (18).

These data reflect the behavior of HSCs/HPCs in a physiological environment. Adult or neonatal primitive hematopoietic cells reside in low oxygen areas and develop within a 1–4% gradient of O₂ (32, 33). Furthermore, as has been shown, most primitive HSCs reside in areas with very low blood perfusion, implying a limited supply not only of O₂ but also of blood-borne nutrients (34), i.e., an ischemia-like environment is common to HSCs. In the niche, HSCs are in a quiescent phase, and are occasionally recruited into the cell cycle (35, 36). They must also remain capacity for rapid proliferation in response to extrinsic cues, indicating great metabolic plasticity which enables energetic reprogramming on the basis of various functional demands (2).

These properties are in common to cancer cells. While cell growth is markedly reduced under conditions of very low O₂ levels, cancer cells (leukemic cell culture) are capable of expanding significantly compared to Day-0 (37). These

hypoxia-resistant cells shown to be highly immature progenitors (37). Also, severe hypoxia selects *ex vivo* a cell subset with stem cell potential in a population of myelodysplastic syndrome bone marrow cells (38). The cells that survive under these conditions have been shown to be the leukemic stem cells which are potentially responsible for the disease relapsing (39). We have demonstrated here for CB HSCs/HPCs, as has been shown for cancer cells, that expansion is possible at a low oxygen level until glucose is no longer available in the culture medium. In summary, these data indicate that primitive hematopoietic cells, as well as cancer progenitor and stem cells, adapt to survive anoxia and ischemia, conditions often found in cancerous tissue.

Furthermore, our results show that under ischemia-like conditions, primitive hematopoietic cell mitochondria remain functional, and use anaerobic ATP synthesis in order to sustain cellular homeostasis (Figure 4). Recently, evidence has shown fumarate respiration to be an anaerobic energetic pathway utilized by cancer cells in ischemic tumor tissue. In this instance, fumarate is utilized as the final electron acceptor, and fumarate reduction is coupled with an anaerobically-functioning electron transport chain in which electrons are transferred from NADH to fumarate via the complex I, ubiquinone, and a reverse reaction of the complex II (fumarate reductase), resulting in succinate formation. Only complex I functions as a proton pump, generating a proton gradient that drives ATP synthesis (25).

The accumulation of succinate we detected suggests that primitive hematopoietic cells activate fumarate respiration under ischemia-like conditions (Figure 4), meaning that HSCs/HPCs could in fact adapt by using the same metabolic energetic solvating pathway as cancer cells. By introducing a fumarate reductase-specific inhibitor, and assessing HSC/HPC population maintenance, we were able to identify activation of the NADH fumarate reductase system. We observed that introducing pyruvium pamoate (which inhibits NADH fumarate reductase), prevents mesenchymal stem cells surviving under ischemia-like conditions, and triggers energetic failure (unpublished data, article in preparation). Based on these findings and the results presented in this article, we propose that this system could be activated under ischemia-like conditions in HSCs/HPCs.

It should be noted that when analyzing the metabolic pathway in anaerobic respiration, such analysis should include fatty acid β -oxidation (a known alternative energetic fuel in the face of a glucose shortage) as fatty acid β -oxidation yields reducing equivalents of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (40). These could deliver electrons to the electron transport chain (complex I), thereby sustaining anaerobic mitochondrial ATP generation via fumarate respiration in an anoxic and aglycemic environment.

Our study provides evidence that primitive hematopoietic cells exhibit metabolic and energetic flexibility, notably the ability

to shift between aerobic, or anaerobic energetic modes in order to adapt to various environmental conditions. These features, especially “fumarate respiration,” were thus far considered to be specific to cancer cells, which is clearly not the case. We propose that since they are common to both, normal and cancer stem cells, these primitive metabolic features should be considered as markers of stemness.

Our work provides findings that could be important in the development of cell therapy procedures.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/**Supplementary Material**.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

VL, AB, AR, PD, and LR performed the experiments. PB provided intellectual input and helped with data analysis. NG edited the text and corrected the translation. ZI provided the original idea for the project. MV-L and ZI conceived the study and wrote the manuscript. MV-L supervised the experimental work and did the data analysis.

FUNDING

This study was supported by the Etablissement Français du Sang Nouvelle Aquitaine Bordeaux, regional research and development budget.

ACKNOWLEDGMENTS

Our thanks go to Mrs. Elisabeth Doutreloux-Volkman (EFS Nouvelle Aquitaine, Bordeaux) and Ms. NG for language corrections.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.00713/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | *in vitro* evaluation of the differentiation potential of individual CD34⁺CD38^{low}CD133⁺CD90⁺CD45RA⁻ cells in single-cell culture. Single cells were selected from the various experimental conditions (AA, anoxia, or 3% O₂), and plated into individual wells. Clones produced in primary culture from one individual cell were co-cultivated on a mesenchymal stromal layer for 30 days. Cells were then collected and assayed for myeloid (CD45⁺CD33⁺) or lymphoid differentiation (CD45⁺CD19⁺). Results are shown with bars representing the mean percentage of CD45⁺CD33⁺ or CD45⁺CD19⁺-expressing cells obtained per colony developed from one individual cell.

REFERENCES

- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. (1994) 367:645–8. doi: 10.1038/367645a0
- Ivanovic Z, Vlaski-Lafarge M. (2015). *Anaerobiosis and Stemness An Evolutionary Paradigm*. Elsevier: Academic Press.
- Deberardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. (2016) 2:e1600200. doi: 10.1126/sciadv.1600200
- Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab*. (2016) 23:27–47. doi: 10.1016/j.cmet.2015.12.006
- Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol*. (1927) 8:519–30. doi: 10.1085/jgp.8.6.519

6. Obre E, Rossignol R. Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* (2015) 59:167–81. doi: 10.1016/j.biocel.2014.12.008
7. Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Kobayashi H, Ikeda E, et al. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* (2013) 12:49–61. doi: 10.1016/j.stem.2012.10.011
8. Kocabas F, Xie L, Xie J, Yu Z, Deberardinis RJ, Kimura W, et al. Hypoxic metabolism in human hematopoietic stem cells. *Cell Biosci.* (2015) 5:39. doi: 10.1186/s13578-015-0020-3
9. Ito K, Carracedo A, Weiss D, Arai F, Ala U, Avigan DE, et al. A PML-PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med.* (2012) 18:1350–8. doi: 10.1038/nm.2882
10. Ito K, Suda T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2014) 15:243–56. doi: 10.1038/nrm3772
11. Cavalli LR, Varella-Garcia M, Liang BC. Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. *Cell Growth Differ.* (1997) 8:1189–98.
12. Tan AS, Batty JW, Dong LF, Bezaork-Geleta A, Endaya B, Goodwin J, et al. Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab.* (2015) 21:81–94. doi: 10.1016/j.cmet.2014.12.003
13. Lebleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, et al. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol.* (2014) 992–1003:1001–15. doi: 10.1038/ncb3039
14. Tomitsuka E, Kita K, Esumi H. An anticancer agent, pyruvium pamoate inhibits the NADH-fumarate reductase system—a unique mitochondrial energy metabolism in tumour microenvironments. *J Biochem.* (2012) 152:171–83. doi: 10.1093/jb/mvs041
15. Vlaski M, Negroni L, Kovacevic-Filipovic M, Guibert C, Brunet De La Grange P, Rossignol R, et al. Hypoxia/hypercapnia-induced adaptation maintains functional capacity of cord blood stem and progenitor cells at 4 degrees C. *J Cell Physiol.* (2014) 229:2153–65. doi: 10.1002/jcp.24678
16. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell.* (2007) 1:635–45. doi: 10.1016/j.stem.2007.10.001
17. Vlaski-Lafarge M, Loncaric D, Perez L, Labat V, Debeissat C, Brunet De La Grange P, et al. Bioenergetic changes underline plasticity of murine embryonic stem cells. *Stem Cells.* (2019) 37:463–75. doi: 10.1002/stem.2965
18. Ivanovic Z, Hermitte F, Brunet De La Grange P, Dazey B, Belloc F, Lacombe F, et al. Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O₂ concentration (3%). *Stem Cells.* (2004) 22:716–24. doi: 10.1634/stemcells.22-5-716
19. Loncaric D, Labat V, Debeissat C, Brunet De La Grange P, Rodriguez L, Vlaski-Lafarge M, et al. The majority of cells in so-called “mesenchymal stem cell” population are neither stem cells nor progenitors. *Transfus Clin Biol.* (2019) 26:316–23. doi: 10.1016/j.tracbi.2018.08.157
20. Chevaleyre J, Duchez P, Rodriguez L, Vlaski M, Villacreces A, Conrad-Lapostolle V, et al. Busulfan administration flexibility increases the applicability of scid repopulating cell assay in NSG mouse model. *PLoS ONE.* (2013) 8:e74361. doi: 10.1371/journal.pone.0074361
21. Lapostolle V, Chevaleyre J, Duchez P, Rodriguez L, Vlaski-Lafarge M, Sandvig I, et al. Repopulating hematopoietic stem cells from steady-state blood before and after *ex vivo* culture are enriched in the CD34(+)CD133(+)/CXCR4(low) fraction. *Haematologica.* (2018) 103:1604–15. doi: 10.3324/haematol.2017.183962
22. Dick JE, Bhatia M, Gan O, Kapp U, Wang JC. Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. *Stem Cells.* (1997) 15(Suppl. 1):199–203. doi: 10.1002/stem.5530150826
23. Hammoud M, Vlaski M, Duchez P, Chevaleyre J, Lafarge X, Boiron JM, et al. Combination of low O₂ concentration and mesenchymal stromal cells during culture of cord blood CD34(+) cells improves the maintenance and proliferative capacity of hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol.* (2012) 227:2750–8. doi: 10.1002/jcp.23019
24. Mantel C, Messina-Graham S, Broxmeyer HE. Upregulation of nascent mitochondrial biogenesis in mouse hematopoietic stem cells parallels upregulation of CD34 and loss of pluripotency: a potential strategy for reducing oxidative risk in stem cells. *Cell Cycle.* (2010) 9:2008–17. doi: 10.4161/cc.9.10.11733
25. Tomitsuka E, Kita K, Esumi H. The NADH-fumarate reductase system, a novel mitochondrial energy metabolism, is a new target for anticancer therapy in tumor microenvironments. *Ann N Y Acad Sci.* (2010) 1201:44–9. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05620.x
26. Vander Heiden MG, Deberardinis RJ. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell.* (2017) 168:657–69. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.039
27. Hermitte F, Brunet De La Grange P, Belloc F, Praloran V, Ivanovic Z. Very low O₂ concentration (0.1%) favors G0 return of dividing CD34+ cells. *Stem Cells.* (2006) 24:65–73. doi: 10.1634/stemcells.2004-0351
28. Guitart AV, Debeissat C, Hermitte F, Villacreces A, Ivanovic Z, Boeuf H, et al. Very low oxygen concentration (0.1%) reveals two FDCP-Mix cell subpopulations that differ by their cell cycling, differentiation and p27KIP1 expression. *Cell Death Differ.* (2011) 18:174–82. doi: 10.1038/cd.2010.85
29. Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivetto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood.* (1993) 82:2031–7. doi: 10.1182/blood.V82.7.2031.2031
30. Cipolleschi MG, D'ippolito G, Bernabei PA, Caporale R, Nannini R, Mariani M, et al. Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E *in vitro*. *Exp Hematol.* (1997) 25:1187–94.
31. Ivanovic Z, Dello Sbarba P, Trimoreau F, Faucher JL, Praloran V. Primitive human HPCs are better maintained and expanded *in vitro* at 1 percent oxygen than at 20 percent. *Transfusion.* (2000) 40:1482–8. doi: 10.1046/j.1537-2995.2000.40121482.x
32. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2007) 104:5431–6. doi: 10.1073/pnas.0701152104
33. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J Cell Physiol.* (2009) 219:271–5. doi: 10.1002/jcp.21690
34. Levesque JB, Winkler IG. Hierarchy of immature hematopoietic cells related to blood flow and niche. *Curr Opin Hematol.* (2011) 18:220–5. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283475fe7
35. Bradford GB, Williams B, Rossi R, Bertonecello I. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol.* (1997) 25:445–53.
36. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, et al. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell.* (2011) 147:1146–58. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.053
37. Giuntoli S, Roviada E, Gozzini A, Barbetti V, Cipolleschi MG, Olivetto M, et al. Severe hypoxia defines heterogeneity and selects highly immature progenitors within clonal erythroleukemia cells. *Stem Cells.* (2007) 25:1119–25. doi: 10.1634/stemcells.2006-0637
38. Masala E, Valencia-Martinez A, Pillozzi S, Rondelli T, Brogi A, Sanna A, et al. Severe hypoxia selects hematopoietic progenitors with stem cell potential from primary Myelodysplastic syndrome bone marrow cell cultures. *Oncotarget.* (2018) 9:10561–71. doi: 10.18632/oncotarget.24302
39. Roviada E, Marzi I, Cipolleschi MG, Dello Sbarba P. One more stem cell niche: how the sensitivity of chronic myeloid leukemia cells to imatinib mesylate is modulated within a “hypoxic” environment. *Hypoxia.* (2014) 2:1–10. doi: 10.2147/HP.S51812
40. Houten SM, Wanders RJ. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *J Inherit Metab Dis.* (2010) 33:469–77. doi: 10.1007/s10545-010-9061-2

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Vlaski-Lafarge, Labat, Brandy, Refeyton, Duchez, Rodriguez, Gibson, Brunet de la Grange and Ivanovic. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article

Regulatory Crosstalk between Physiological Low O₂ Concentration and Notch Pathway in Early Erythropoiesis

Véronique Labat^{1,2,3}, Eva Nguyen van Thanh dit Bayard^{1,2,3}, Alice Refeyton^{1,2,3}, Mathilde Huart^{1,2,3} , Maryse Avalon^{1,2,3}, Christelle Debeissat^{1,2,3}, Laura Rodriguez^{1,2,3}, Philippe Brunet de la Grange^{1,2,3} , Zoran Ivanovic^{1,2,3}  and Marija Vlaski-Lafarge^{1,2,3,*}

- ¹ R&D Department, Etablissement Français du Sang Nouvelle-Aquitaine, 33075 Bordeaux, France; veronique.labat@efs.sante.fr (V.L.); nguyeneva@hotmail.fr (E.N.v.T.d.B.); alice.refeyton.ext@efs.sante.fr (A.R.); mathilde.huart@u-bordeaux.fr (M.H.); maryse.avalon@efs.sante.fr (M.A.); christelle.debeissat@u-bordeaux.fr (C.D.); laura.rodriguez@efs.sante.fr (L.R.); philippe.brunet-de-la-grange@efs.sante.fr (P.B.d.l.G.); zoran.ivanovic@efs.sante.fr (Z.I.)
- ² Inserm Bordeaux UMR 1035, 33000 Bordeaux, France
- ³ Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France
- * Correspondence: marija.vlaski@efs.sante.fr

Abstract: Physiological low oxygen (O₂) concentration (<5%) favors erythroid development ex vivo. It is known that low O₂ concentration, via the stabilization of hypoxia-induced transcription factors (HIFs), intervenes with Notch signaling in the control of cell fate. In addition, Notch activation is implicated in the regulation of erythroid differentiation. We test here if the favorable effects of a physiological O₂ concentration (3%) on the amplification of erythroid progenitors implies a cooperation between HIFs and the Notch pathway. To this end, we utilized a model of early erythropoiesis ex vivo generated from cord blood CD34⁺ cells transduced with shHIF1 α and shHIF2 α at 3% O₂ and 20% O₂ in the presence or absence of the Notch pathway inhibitor. We observed that Notch signalization was activated by Notch2R–Jagged1 ligand interaction among progenitors. The inhibition of the Notch pathway provoked a modest reduction in erythroid cell expansion and promoted erythroid differentiation. ShHIF1 α and particularly shHIF2 α strongly impaired erythroid progenitors' amplification and differentiation. Additionally, HIF/NOTCH signaling intersects at the level of multipotent progenitor erythroid commitment and amplification of BFU-E. In that, both HIFs contribute to the expression of Notch2R and Notch target gene *HES1*. Our study shows that HIF, particularly HIF2, has a determining role in the early erythroid development program, which includes Notch signaling.

Keywords: erythropoiesis; CD34⁺ cells; HIF; Notch; progenitors; BFU-E; CFU-E; low O₂ concentration; differentiation



Citation: Labat, V.; Bayard, E.N.v.T.d.; Refeyton, A.; Huart, M.; Avalon, M.; Debeissat, C.; Rodriguez, L.; de la Grange, P.B.; Ivanovic, Z.; Vlaski-Lafarge, M. Regulatory Crosstalk between Physiological Low O₂ Concentration and Notch Pathway in Early Erythropoiesis. *Biomolecules* **2022**, *12*, 540. <https://doi.org/10.3390/biom12040540>

Academic Editor: Anna Rita Franco Migliaccio

Received: 15 February 2022

Accepted: 30 March 2022

Published: 2 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Multilevel action of physiologically low O₂ concentration (<5%) as a regulatory factor in hematopoiesis/erythropoiesis has been well established in vivo and ex vivo [1,2]. Additionally, the adaptation of oxygenation to each stage of erythropoiesis by the level existing in vivo enhances the efficiency and production of RBC ex vivo [2]. Beyond the systemic regulatory feedback mechanism via the stimulation of mandatory erythropoietic hormone erythropoietin (EPO) production, a number of studies have shown that low O₂ favors: (1) the production of EPO-unresponsive erythroid progenitors (BFU-E) from more primitive myeloid progenitors; (2) production of EPO-responsive erythroid progenitors (CFU-E), presumably from BFU-E; (3) CFU-E differentiation to generate an erythroid precursor [3–9]. In our previous work, we showed that this positive impact of low O₂ concentrations on erythroid progenitors operates via shortening their cell cycle and, consequently, enhancing their amplification, but without impairing their proliferative capacity [2]. The aim of this

study is to obtain insight into the analysis of possible underlying molecular pathways. Metabolic set-up in the response to a low O₂ environment integrates a complex molecular network and in the first line is mediated by a family of transcription factors, hypoxia-inducible factors (HIFs) (predominately HIF-1 and HIF-2) [10]. They are heterodimeric proteins that comprise one of three isoforms of: the α subunit (HIF1-3 α), stabilized when the O₂ concentration is <5% or upon cytokine stimulation, and the β subunit, which is constitutively expressed [11,12]. Once stabilized, HIF-1 α and HIF-2 α are translocated in the nucleus where they are associated with β subunits in order to form functional HIF transcription factors that facilitate the transcription of a vast number of target genes, including those regulating erythropoiesis. In different cell models, HIFs interplay with other signaling pathways such as Notch at the level of the signal triggering, transcription or functional regulation [13–15]. This is an evolutionarily conserved signaling pathway that controls differentiation in most metazoan cell types [16]. Different models show the role of Notch signaling in hematopoiesis/erythropoiesis. In addition to its role in the maintenance and ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells [17,18], the activation of Notch in human and murine primitive hematopoietic cells (via the interactions with the Notch ligand expressing stroma or by the soluble ligand present in culture medium or the genetically constructed, constitutively active mutant) promotes their differentiation toward erythroid lineage [19–22].

The activation of Notch signalization is triggered by paracrine interaction of Notch receptors (Notch1-4) with specific ligands (Delta (DII 1,3,4) and Jagged/serrate (Jag1,2)) [23] expressed on a wide spectrum of hematopoietic and stromal cells. These include multipotent CD34⁺ progenitors as well as erythroid progenitors and early erythroblasts [24]. This implies that Notch signaling during hematopoiesis may be mediated not only by interactions between hematopoietic and stromal cells, but also by homotypic interactions between the hematopoietic progenitors themselves [25].

In this study, we purposely analyze the hypothesis that low O₂-mediated stimulation of erythroid progenitor expansion comprises a crosstalk between Notch and HIF pathways. To that end, we utilized the protocol of ex vivo erythroid development from cord blood (CB) CD34⁺ cells with silenced HIF1 α and HIF2 α .

Our study showed that HIFs, particularly HIF2, have a determining role in the control of an early erythroid development program, which, among others, includes Notch signaling. We demonstrate that HIF/NOTCH signaling intersect at the state of multipotent progenitor erythroid commitment and the amplification of early erythroid progenitors, where HIF regulates Notch signaling concerning signal triggering and gene expression.

2. Materials and Methods

2.1. CD34⁺ Cell Isolation

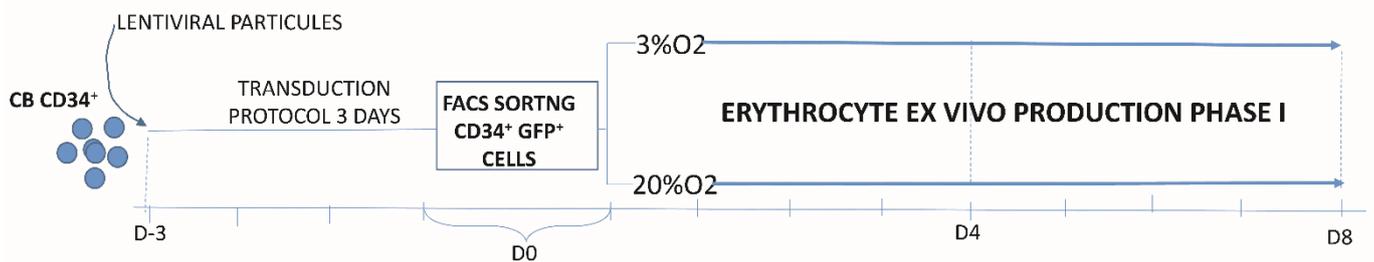
Cord blood (CB) samples delivered (with the mother's approval) to the Cell Therapy Unit of the French Blood Institute, Bordeaux, that had been rejected for banking were used for the experiments (in compliance with national French regulation, declared to the Ministry of Research: DC-2019-3720). CB CD34⁺ cells were isolated using an immunomagnetic technique (Miltenyi Biotec, Paris, France), giving a highly (at least 90%) enriched CD34⁺ fraction [26].

2.2. Generation of Lentiviral Vectors and Viral Particles

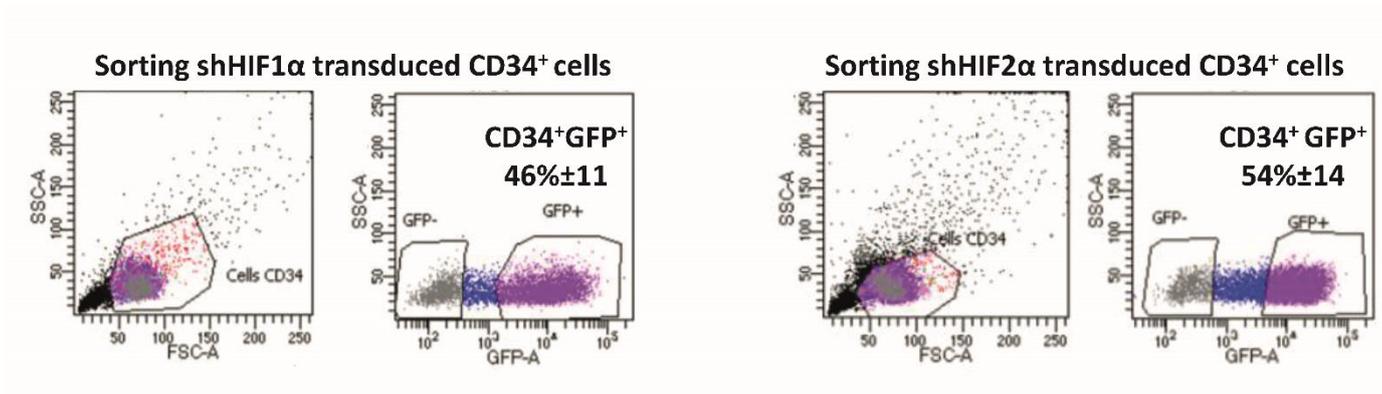
DNA constructs (21 bp sense and antisense oligonucleotides designed in the 3'-coding region of the human HIF-1 α and HIF-2 α genes) were kindly provided by the vectorology facility Vect'UB, University of Bordeaux, and were prepared as described in [27]. Briefly, DNA fragments (Eurogentec, Angers, France) were cloned in the pic20-plasmid behind the polymerase III H1 promoter. H1-shRNA sequences were subcloned in the lentivirus (pTrip Δ U3Efl α -EGFP Δ MCS Δ U3), which contains the enhanced GFP (eGFP) gene under the control of the EF1 α promoter. Lentiviral supernatants were produced by transient CaCl₂ transfection of HEK293T cells.

2.3. Transduction Protocol for CD34⁺ Cells

CB CD34⁺ cells (10⁶ cell/mL) were cultured for 72 h in Iscove medium (IMDM; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 15% bovine serum albumin (BSA)/insulin/transferrin (BIT 9500; Stemcell Technologies, Saint Égrève, France), recombinant human (rhu) stem cell factor (SCF; 100 ng/mL), Flt3-ligand (FL; 100 ng/mL), Interleukin-3 (IL-3; 60 ng/mL), and TPO (TPO; 20 nM). All the cytokines were purchased from Peprotech, Neuilly-Sur-Seine, France. Concentrated shRNA to HIF1 α and shRNA to HIF2 α were added at a concentration of 25 MOI (Multiplicity Of Infection) twice at 24 h intervals. The control was non-transduced cells (NT). After transduction, the cells were washed twice and counted, and sorted based on GFP expression, which was analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS CANTO II, Becton Dickinson, Rungis, France). The results of transduction efficiency based on GFP expression in cells are shown in Figure 1.



(a)



(b)

Figure 1. Experimental design. (a) Cord blood CD34⁺ cells (10⁶ cell/mL) were cultured (Day 3 to Day 0) for three days and transduced with shRNA to HIF1 α and shRNA to HIF2 α at a concentration of 25 MOI (Multiplicity Of Infection) twice at 24 h intervals. As control, we used non-transduced cells (NT). Then, transduced cells were sorted based on Green Fluorescence Protein (GFP) expression by FACS and plated in the erythroid culture protocol for 8 days (Day 0 to Day 8). Non-transduced CD34⁺ cells in presence or absence of Notch γ -secretase inhibitor DAPT as well as transduced CD34⁺ cells with shHIF1 α or with shHIF2 α were grown in erythroid medium for 8 days at 20% and at 3% O₂. At selected time points, cells were stained with antibodies for flow cytometry or immunofluorescence, assayed for their CFC content, underwent CFSE staining or were proposed for real-time polymerase chain reaction (PCR) as described in materials and methods. (b) The representative dot plot showing FACS sorting based on GFP expression giving the transduction efficiency of lentiviral particles containing shHIF1 and shHIF2 in CD34⁺ cells.

2.4. Erythroid Cell Cultures

Transduced CDD34 cells with shRNA to HIF1 (shHIF1) α or to HIF2 α (shHIF2), as well as non-transduced cells (NT), were plated in the modified serum-free medium supplemented with 1% deionized bovine serum albumin, 120 ng/mL iron-saturated human transferrin, 900 ng/mL ferrous sulfate, 90 ng/mL ferric nitrate and 10 mg/mL insulin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). In NT conditions, cells were cultivated in the presence or absence inhibitor of Notch signaling, the γ -Secretase inhibitor (Abcam, Cambridge, UK). Cultures were performed at O₂ concentrations supposed to correspond to the physiological stages in erythroid development [2]. Using phase I (Day 0 to Day 8) from the protocol published by Douay's group [28], 10⁴/mL cells were cultivated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂/3% O₂ (Proox Culture Chamber, Model C174 with the O₂ regulator Pro-ox 110 and CO₂ regulator Pro-CO₂; Biospherix, Redfield, NY, USA) or 20% O₂ (Incubator Igo 150 Cell Life; Jouan, St. Herblain, France) in the presence of 10⁶ M hydrocortisone (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 100 ng/mL stem cell factor (SCF) (PeproTech, Neuilly-Sur-Seine, France), 5 ng/mL interleukin-3 (PeproTech), and 3 U/mL EPO (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ, USA). The cells are incubated in presence or absence of Notch signaling pathway γ -secretase inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-s-phenylglycine-butyl ester) (Abcam, Cambridge, UK) at the final concentration of 100 μ M, which we previously determined as the concentration inducing a significant decrease in erythroid cell expansion without causing their apoptosis (data not shown). At selected time points, cells were stained with antibodies for flow cytometry or immunofluorescence, assayed for their CFC content, CFSE stained or proposed for real-time polymerase chain reaction (PCR), as described later.

2.5. CFC Assay

The hematopoietic committed progenitors (BFU-E, CFU-E, and CFU-granulocyte macrophage) were assayed as described previously [26]. Briefly, cultivated cells harvested at Day 4 or Day 8 were seeded in concentrations of 600/mL or 1200/mL, respectively, in the (a) cytokine-supplemented methycellulose Methocult 4034 (StemCell Technology, Saint Égrève, France), and colonies (BFU-E, CFU-granulocyte macrophage) were counted after 14 days of culture; (b) for the detection of CFU-E progenitors, the cultivated cells were seeded in only EPO-supplemented methycellulose Methocult 4330 (StemCell Technology, Saint Égrève, France) and the colonies were counted after 7 days of culture. Incubation proceeded at 37 °C in a humidified atmosphere with 20% O₂ and 5% CO₂.

2.6. Phenotypic Analysis

In order to characterize the differentiation level of erythroid cells during the culture, we analyzed the expression of glycophorin A (GPA) and transferrin receptor (CD71). GPA is absent from committed erythroid progenitors (i.e., BFU-E, CFU-E), but appears on morphologically recognizable basophilic erythroblasts and remains stably expressed on mature erythrocytes [29]. The transferrin receptor starts to be detected before GPA at the BFU-E stage, reaches a maximum on recognizable erythroblasts and progressively disappears at the late reticulocyte stage [29]. Additionally, in order to follow Notch receptor presentation during early erythropoiesis, Notch 1 and Notch2 receptor (R) expression was analyzed. Cells were harvested at different time points (from D-3 to D8) in phosphate-buffered saline with 1% human serum albumin. Cells were then stained with Brilliant Violet 421-conjugated anti-CD71, phycoerythrin-conjugated anti-GPA (BD Biosciences, Le Pont-de-claix, France) and allophycocyanin-conjugated anti-Notch1R (ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA) and phycoerythrin-conjugated anti-Notch 2R (ThermoFisher scientific) for 25 min in dark and washed and analyzed on flow cytometer. Isotype control antibodies were used as controls for background fluorescence.

2.7. RNA Isolation and Quantitative Real-Time PCR

In order to examine Notch signaling expression during early erythropoiesis and its interplay with HIF-mediated pathways, cells were harvested at Day 4 and Day 8 of culture from all experimental conditions (NT, shHIF1 shHIF2 at 3% and 20% O₂) for real-time PCR analysis. The NOTCH target genes *HES1* and *HEY2* were assayed. For RNA isolation, 800 µL of TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) was added to the cells and RNA was prepared according to the manufacturer's instructions. The reverse transcriptase (RT)/DNase step was performed with the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantitative real-time PCR was performed using the Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System in a 25 µL reaction volume containing 5 µL of cDNA (1:20 dilution of the reverse-transcribed sample), 12.5 µL of SYBR Green SuperMix (Quanta Bioscience, Gaithersburg, MD, USA), and primer pairs at a final concentration of 0.5 µM. The PCR program included a denaturation step at 95 °C for 10 min, an amplification step for 40 cycles (15 s at 95 °C, 30 s at 60 °C) and a final dissociation curve step in order to determine the specificity of the product. Samples were duplicated for each run. Relative quantification was performed by calculating the $2^{\Delta\Delta C_t}$ value. Human β -actin, known to remain constant in the experimental conditions, was used as the reference gene to normalize all results [2,27]. Relative gene expression was calculated with respect to the control condition, cDNA obtained from CB CD34⁺ cells. The list of primers used for real-time quantitative PCR experiments is presented in the Supplementary Table S1.

2.8. CFSE Staining

Fluorescent dye CFSE was used for proliferative history analysis, as described previously [30]. Briefly, freshly isolated CD34⁺ cells in the presence or absence of DAPT were incubated for 30 min with CFSE dye (100 µM final) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions, washed extensively, and resuspended in cell culture medium. CFSE fluorescence of Day 0 CD34⁺ cells were measured on a flow cytometer (FACS CANTO II, Becton Dickinson, France) immediately after labeling and at the selected culture time points.

2.9. Propidium Iodide Cell Viability Assay

Assay is performed following previously published protocol based on the DNA intercalating agent propidium iodide (Beckman Coulter, Villepinte, France) with easy penetration in the damaged membranes of non-viable cells [31]. Briefly, 5×10^4 cells harvested at Day 4 and Day 8 of culture were labeled with PI (10 mg/mL) for 15 min at 4 °C, washed in PBS buffer, and analyzed on a flow cytometer (Becton Dickinson Bioscience, FACS Canto II, Rungis, France). The intensity of the fluorescence was acquired in the yellow and red filter range.

2.10. Statistical Analysis

Data are expressed as the mean \pm SD (standard deviation). When $n < 30$ and due to the absence of normal distribution, the experimental conditions were first tested with Kruskal–Wallis, then with the non-parametric Wilcoxon–Mann–Whitney paired comparison tests. Statistical significance is considered at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Erythroid Cell Expansion Is Abrogated When Notch and HIF-Associated Pathways Are Inhibited

We evaluated the erythroid cell expansion in the situation where the NOTCH or HIF-induced signaling pathways are inhibited, using the first phase of ex vivo erythropoiesis comprising the commitment of multipotent CD34⁺ hematopoietic progenitors to erythroid lineage, the apparition and amplification of erythroid progenitors and early precursor differentiation [2]. Low-O₂-induced metabolic response is mediated majorly by HIF1 and HIF2 transcription factors. In order to elucidate their respective role, CB CD34⁺ cells were

transduced with bicistronic lentiviral vectors carrying two distinct promoters, EF1a and H1, driving green fluorescent protein (GFP) (reporter) and a small hairpin RNA (shRNA) against the HIF1 α or HIF2 α subunits, respectively (sequences published by Rouault-Pierre et al. [27]). CD34⁺ CB was transduced (with 46% \pm 11 for shHIF1 α and 54% \pm 14 for shHIF2 α transduction efficiency) and FACS-sorted 3 days post-transduction, and cultured for an additional 8 days in the presence of growth factors at low (3%) and standard O₂ concentrations (20%) (Figure 1a,b).

We observed that incubation at low O₂ conditions alone markedly increased the total cell number compared with standard conditions, as expected. In addition, HIF2 α silencing (shHIF2) and, to a lesser extent, HIF1 α markedly reduced erythroid cell expansion in both O₂ culture conditions (for shHIF2 > 90% of cell expansion reduction compared to NT condition at Day 8 (D8)) (Figure 2a,b). Regarding shHIF1 α , these effects are significantly more pronounced at 3% O₂ (approximately 80% inhibition in the shHIF1 condition compared to 60% in the same conditions at 20% O₂). Thus, HIF stabilization (by environmental low O₂ concentration or by growth factors present in the culture medium at 20% O₂), particularly HIF2, exhibits a critical role in the early erythroid cell development ex vivo.

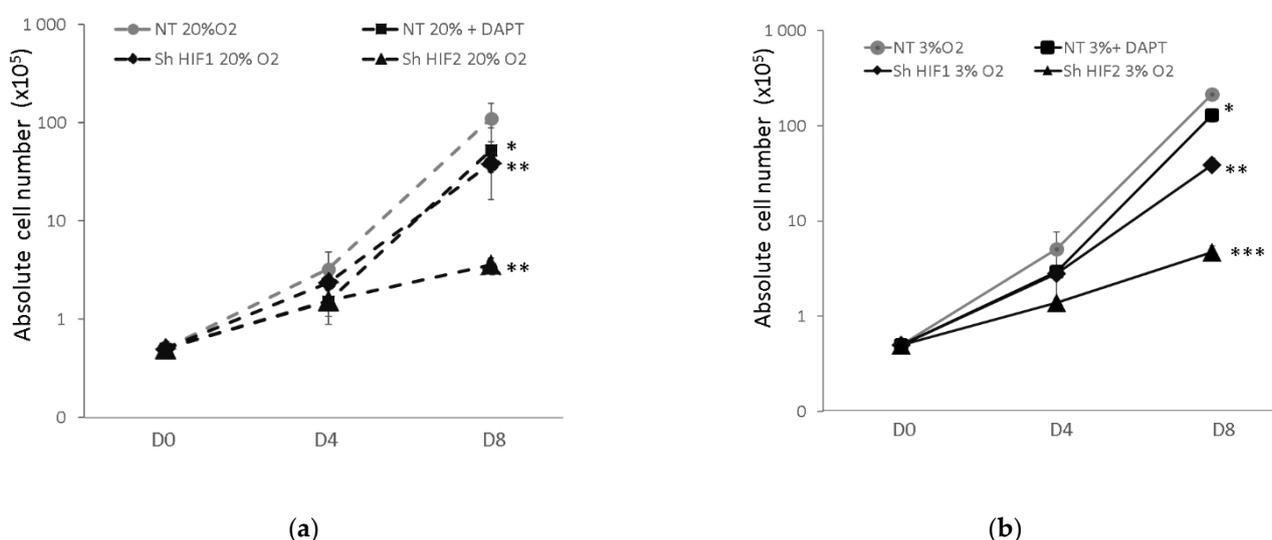


Figure 2. Erythroid cell expansion Non-transduced CD34⁺ cells in presence (■) or absence (●) of Notch γ -secretase inhibitor DAPT as well as transduced CD34⁺ cells with shHIF1 α (◆) or with shHIF2 α (▲) were grown in erythroid medium for 8 days at 20% (dashed line, (a)) and at 3% O₂ (solid line (b)). Data represent the absolute number of cells obtained from 50 \times 10³ CD34⁺ cell at Day 0. The values are expressed as the mean \pm SD of seven independent experiments at the logarithmic scale. Asterisks indicate a significant difference with respect to NT condition, at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), Mann–Whitney test. NT, non-transduced CD34⁺ cells; D, day of culture.

Considering the Notch juxtacrine pathway, it has been previously shown that it could be triggered by homotypic interactions between hematopoietic cells during erythroid development [25,32,33]. Taking this into account, we showed that the incubation of NT CD34⁺ cells in the presence of Notch signaling γ -secretase inhibitor DAPT significantly, but less pronouncedly than HIF, reduced the erythroid cell number at 3% as well as at 20% O₂, affirming its role in the early erythroid development ex vivo. Additionally, the decrease in total cell expansion is associated with the decrease in cell survival in the case of the inhibition of HIF mediation, but not Notch signaling (Supplementary Figure S1). That is the reason why we performed the tracking cell division history by CFSE staining. This showed that the inhibition of Notch signaling reduces the percentage of cells detected in the fraction of most divided cells. This indicates that the reduction in expansion in the presence of Notch inhibitor comes from the decrease in the proliferation rate of the early erythroid proliferative compartment (Supplementary Figure S2).

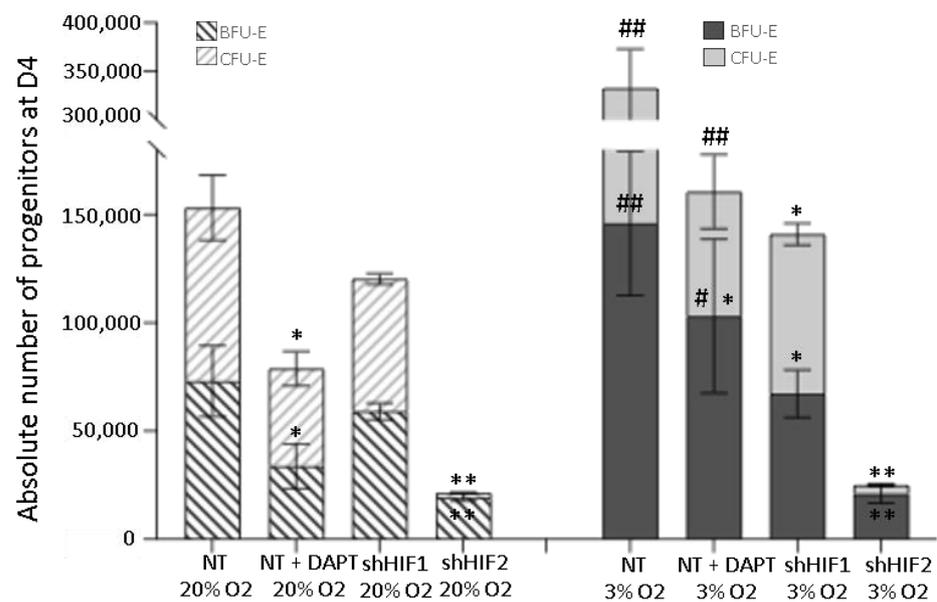
3.2. Erythroid Progenitor Amplification Is Differently Modified When the HIF-Mediated or Notch Pathway Are Inhibited

In order to investigate if the observed cell expansion reduction is associated with the modulated erythroid progenitor's amplifications, we assayed erythroid colony formation (Figure 2). Low oxygen culture alone induced a significant increase in erythroid progenitor number (total number of BFU-E and CFU-E is increased by two-fold at Day 4 and to four-fold at Day 8 comparing to standard O₂ conditions) (Figure 3a,b). The analysis at Day 4 and Day 8 of culture showed that in shHIF1 and shHIF2 conditions, we detected significantly fewer early mature erythroid progenitors relative to NT 3% O₂ (Figure 3a,b). While this effect is similar in shHIF2 conditions, the reduction in progenitors in the shHIF1 condition at 20% O₂ is only slight (Figure 3a,b). In contrast, the inhibition of the Notch pathway results in only modest but significant diminution in BFU-E, as well as CFU-E progenitors at Day 4 and Day 8, no matter the oxygen culture concentration. At Day 8, while the number of BFU-E is still significantly reduced upon Notch inhibition, there are no differences in the CFU-E number with respect to NT conditions at both O₂ concentrations. Furthermore, the Day 4 to Day 8 fold change in erythroid progenitor number revealed that inhibition of Notch alone did not impair the amplification of BFU-E progenitors relative to NT condition (20% O₂ NT vs. NT + DAPT: 4 ± 1 vs. 4.3 ± 2 ; 3% O₂ NT vs. NT + DAPT 6 ± 3 vs. 10 ± 4) (Figure 3c). Conversely, a significantly higher fold change is detected for CFU-E number (20% O₂ NT vs. NT + DAPT: 19 ± 9 vs. 72 ± 30 ; 3% O₂: NT vs. NT + DAPT: 61 ± 25 vs. 170 ± 40), which indicates that the inhibition of Notch stimulates differentiation of BFU-E toward CFU-E stage (Figure 3c). Additionally, silencing HIF1 α and HIF2 α significantly diminished the fold change in BFU-E number compared to the NT condition. However, in shHIF1, the same fold change in CFU-E number as detected for BFU-E reveals that, in this condition, BFU-E to CFU-E conversion is not impaired. This comes from the fact that newly formed CFU-E could be only those arisen from BFU-E progenitors, as CFU-E, unlike BFU-E, do not have self-renewing capacity [34]. In contrast, silencing of HIF2 completely abrogated the differentiation of BFU-E to CFU-E stage. Altogether, these results indicate the different and specific role of each examined signaling molecule in early erythropoiesis.

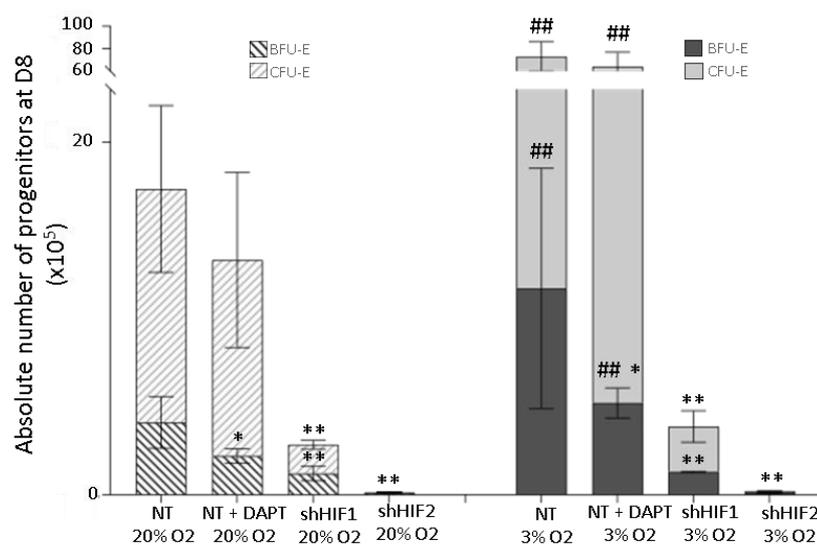
3.3. Erythroid Differentiation Is Altered When HIF-Mediated but Not Notch Pathways Are Inhibited

In order to characterize the differentiation level of erythroid cells during the culture, we analyzed the expression of glycophorin A (GPA) and transferrin receptor (CD71). GPA is absent from committed erythroid progenitors (i.e., BFU-E, CFU-E), but appears on morphologically recognizable basophilic erythroblasts and remains stably expressed on mature erythrocytes [29]. The transferrin receptor starts to be detected before GPA at the BFU-E stage, reaches a maximum on recognizable erythroblasts, and progressively disappears at the late reticulocyte stage [29]. We observed that at Day 4, CD71⁺/GPA⁺ precursor cells represent a minor fraction (Figure 4). Low oxygen alone (3% O₂ NT) stimulates erythroid differentiation, according to a significant increase in percentage and absolute number of precursor cells (CD71⁺/GPA⁺) relative to 20% O₂ (20% O₂ NT). Additionally, inhibition of the Notch pathway increases the occurrence of GPA expression revealed as a significantly higher CD71⁺/GPA⁺ percentage of cells present at Day 4 as well as Day 8 of culture (Figure 4a, Supplementary Figure S3a). Thus, even though the frequency of precursor cells is higher in this condition, we did not obtain a higher total erythroblast number in culture with respect to the NT condition (Figure 4b). This was associated with a smaller number of detected erythroid progenitors, giving rise to the precursor cells that have been developed from CD34⁺ cells. In contrast, erythroid differentiation is severely impaired in shHIF1 and shHIF2 conditions relative to the NT condition, according to the percentage or total number of precursor cells at Day 4 and Day 8 of culture (Figure 4a,b). While the inhibition of Notch did not alter erythroid differentiation, it is severely impaired in the shHIF1 and shHIF2 conditions relative to the NT condition, according to the percentage or total number of precursor cells at Day 4 and Day 8 of culture (Figure 4a,b). These

effects are observed at 3 as well 20% O₂. Additionally, the analysis of overall erythroid commitment (progenitors and precursors cells) reveals that it is differently affected by Notch or HIF-mediated pathways (Supplementary Figure S3b,c). Thus, at Day 4, approximately 50% of cells belong to erythroid lineage (progenitors plus precursors) at 3% O₂, and this number is 30% at 20% O₂. At Day 8, all the cells are erythroid at both O₂ concentrations. The inhibition of Notch alone does not change this development pattern, no matter the O₂ culture concentration. In contrast, in shHIF1 α and particularly shHIF2 α conditions, approximately 90% of cells are non-erythroid lineage at Day 8, revealing severe inhibition of the erythroid differentiation from CB CD34⁺. In this situation, when erythroid progenitor development from multipotent CD34⁺ cells as well as the amplification of progenitors and their differentiation toward precursors are blocked, detected Day 4 to Day 8 cell expansion is related to non-erythroid cells. This suggests that the effects of silencing HIFs, particularly shHIF2 α , are selective for early erythroid commitment stages.



(a)



(b)

Figure 3. Cont.

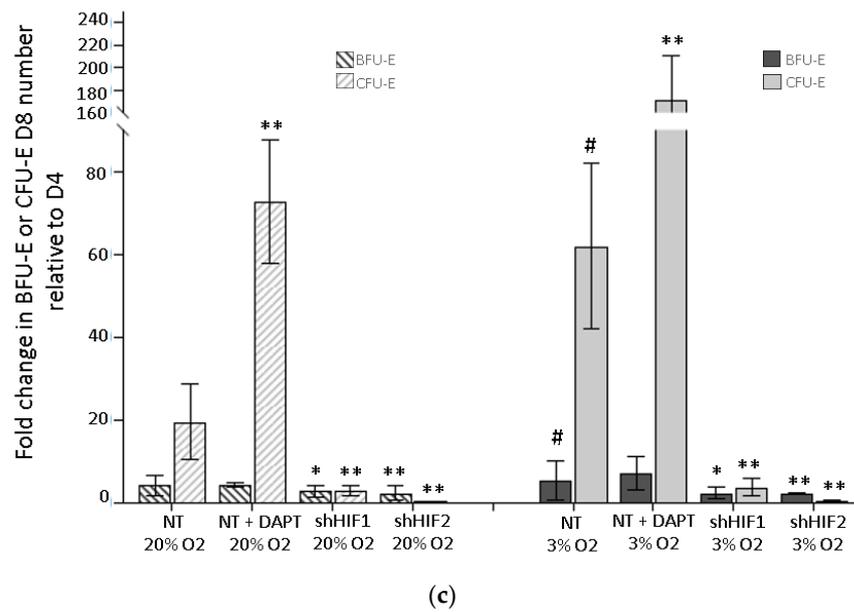


Figure 3. Production of erythroid progenitor. Non-transduced CD34⁺ cells in presence or absence of Notch γ -secretase inhibitor DAPT as well as transduced CD34⁺ cells with shHIF1 α or with shHIF2 α were grown in erythroid medium for 8 days at 20% and at 3% O₂. The numbers of burst-forming unit erythroids (BFU-E) and colony-forming unit erythroids (CFU-E) were estimated after 4 (a) and 8 days of culture (b). Bars represent average values of total number of BFU-E and CFU-E obtained at Day 4 and Day 8 of culture. (c) The values show average fold change in BFU-E or CFU-E Day 8 number relative to Day 4. Data are presented as mean \pm SD of seven independent experiments. Asterisks indicate a significant difference with respect to NT condition, at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**); hashtags indicate a significant difference with respect to 20% O₂ condition, $p < 0.05$ (#), $p < 0.01$ (##), Mann–Whitney test. NT, non-transduced CD34⁺ cells; D, day of culture.

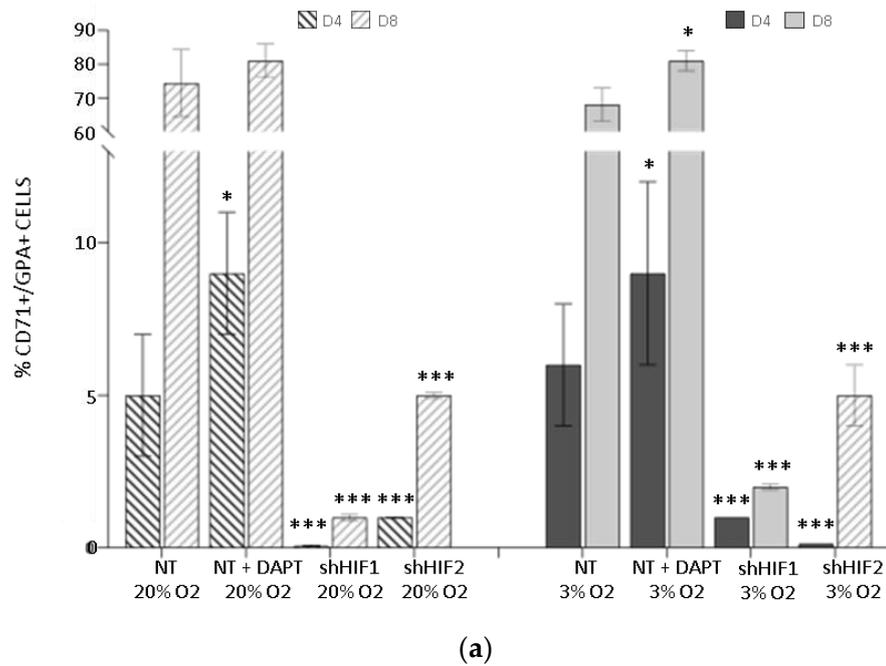
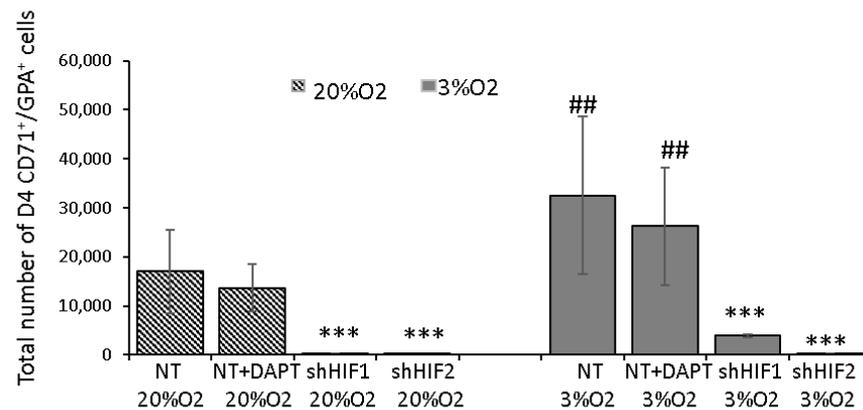


Figure 4. Cont.



(b)

Figure 4. Erythroid differentiation. (a) Glycophorin A (GPA) and Transferrin receptor expression on erythroid cells obtained at Day 4 and Day 8 of culture of non-transduced CD34⁺ cells in presence or absence of Notch γ -secretase inhibitor DAPT as well as transduced CD34⁺ cells with shHIF1 α or with shHIF2 α at 20 and 3% O₂. The bars show the average percentage of GPA⁺/CD71⁺ cells. (b) The average value of total number of GPA⁺/CD71⁺ cells in 4-day culture. Data are presented as mean \pm SD of seven independent experiments. The asterisks indicate a significant difference with respect to NT condition at $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (**); the hashtags indicate a significant difference with respect to 20% O₂ condition at $p < 0.01$ (##), Mann–Whitney test. NT, non-transduced CD34⁺ cells; D, day of culture.

3.4. Notch Signaling Is Modified When HIF1 α and HIF2 α Are Silenced

In order to investigate Notch/HIF interplay in early erythroid development, we started our exploration at the level of signal triggering and analyzed the Notch receptor 1 and 2 (Notch1R, 2R) expression. Flow cytometry analysis revealed that low levels of both receptors are present in native freshly isolated or thawed CD34⁺ cells (Figure 5a). During the erythroid culture, the expression of Notch1R remained at the similar minimal level without significant differences between experimental conditions (data not shown). In contrast, erythroid development comprises a progressive significant increase in the percentage of Notch2R-expressing cells, as well as its quantity per cell (Figure 5a,b), resulting in the presence of Notch2R in almost all the cells by Day 8.

Silencing of both HIF1 and HIF2 diminished the expression of Notch2R on Day 4. At the erythroid stage of development corresponding to Day 4 to Day 8, the inhibition of Notch2R remains markedly inhibited, which is particularly pronounced in the shHIF1 condition (Figure 5a). These phenomena were detected in both O₂ culture conditions. This indicates that stabilized HIF1 and HIF2 enhance the expression of Notch2R. Additionally, keeping in mind that most D8 cells in the shHIF1 and shHIF2 condition are non-erythroid, a decrease in the Notch2R expression with respect to the NT condition could be the consequence of the low Notch2R expression detected during the development of other hematopoietic lineage. Furthermore, juxtacrine Notch signaling in our system is mediated by the interaction between the Notch2R and Jagged1 ligand, which was the only Notch ligand that we could detect (Figure S4). Finally, in order to determine whether Notch–HIF interplay has the effect at the level of gene expression, we estimated the expression of the Notch target *HES1* and *HEY2* genes in native CD34⁺ and erythroid cells at Day 4. We did not detect the expression of *HEY2* in early erythropoiesis. In contrast, the expression of *HES1* was significantly reduced in the shHIF1 and shHIF2 conditions, indicating that there is Notch/HIF interplay at the transcription level (Figure 5c).

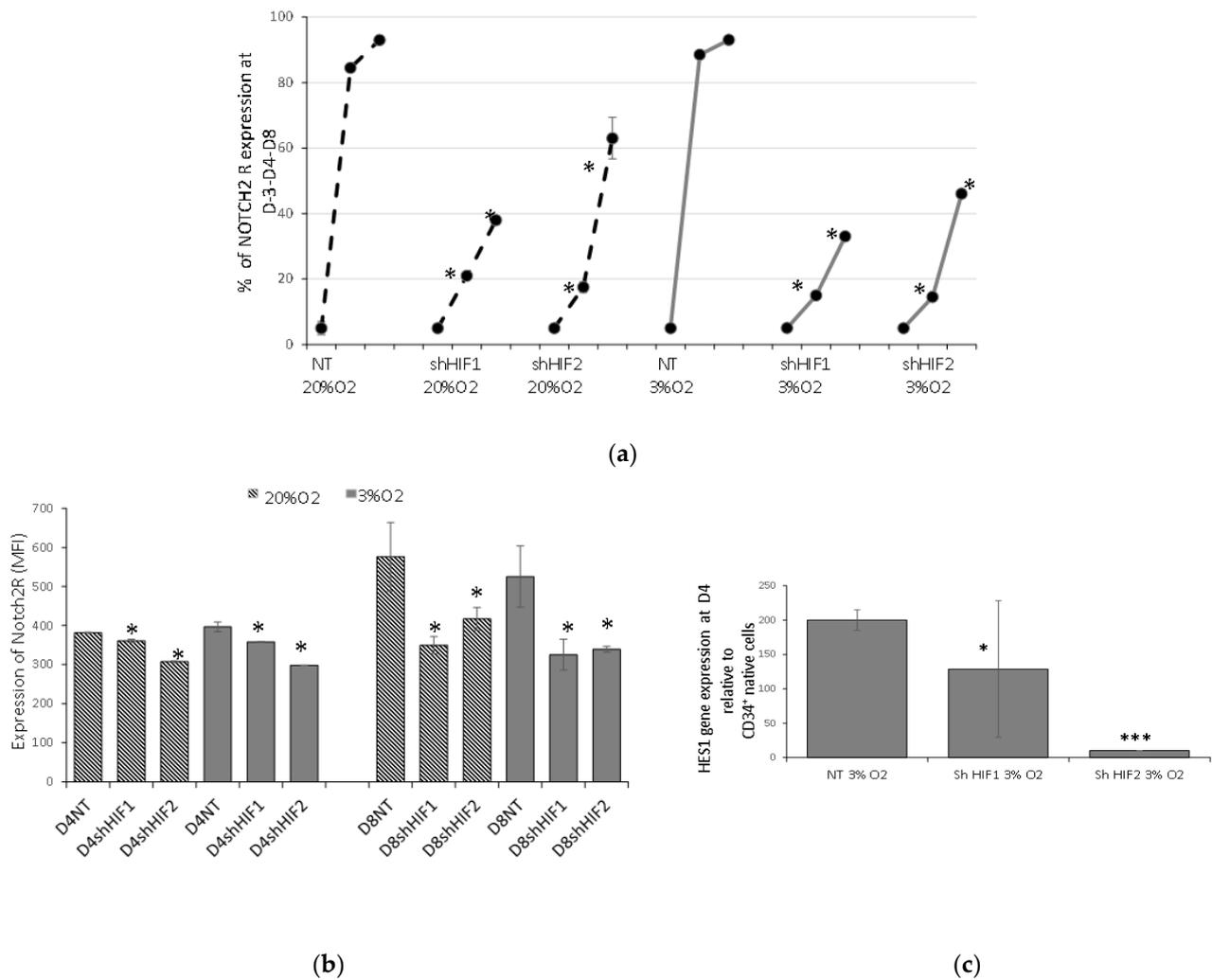


Figure 5. Notch/HIF interplay in early erythroid development. (a) The expression of Notch2 receptors in the cells harvested at the beginning (Day 3, D-3), Day 4 (D 4) and Day 8 (D 8) of eight-day erythroid cultures. The curves represent the average percentage of receptor expression in whole culture. (b) The bars show average mean fluorescence intensity. Data are presented as mean values \pm SD of 4 independent experiments. (c) The expression of Notch target gene *HES1* was evaluated in erythroid cells obtained at Day 4 of culture of non-transduced CD34⁺ cells as well as transduced CD34⁺ cells with shHIF1 α or with shHIF2 α at 20 and 3% O₂ by real-time polymerase chain reaction analysis. Bars represent relative gene expression with respect to native CB CD34⁺ cells. Data are shown as mean \pm SD of five independent experiments. The asterisks indicate a significant difference with respect to NT condition at $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (***), Mann–Whitney test. NT, non-transduced CD34⁺ cells; D, day of culture.

4. Discussion

Our study revealed that concomitant activation of Notch and HIF-mediated pathways, which interplay at the level of the gene expression as well as signal activation, plays a critical role in early erythropoiesis ex vivo. Our 8-day culture system of early erythropoiesis comprises several developmental stages: expansion of multipotent progenitors CD34⁺, their differentiation toward erythroid progenitors, the apparition of early erythroid progenitors self-renewing BFU-E (Day 0–Day 4), and their conversion to mature erythroid progenitors CFU-E and early precursors (Day 4–Day 8°).

Hence, this model gives a suitable system to investigate different erythroid regulatory factors.

As expected and in agreement with our previous results, as well as the results of other authors, a culture maintained at a physiological low O₂ concentration (1.5–5%) favors the production of erythroid progenitors (BFU-E and CFU-E), and their differentiation into early erythroid precursors [2–6,8,9]. The impact of O₂ could be different regarding oxygen content. Thus, at 1% O₂, the production and amplification of BFU-E seem to be enhanced, while their commitment toward CFU-E and further is accomplished at higher O₂ concentrations [7]. Higher O₂ concentrations (3–5%) are needed for the expansion and differentiation of committed myeloid progenitors (colony-forming cells) [26]

In order to distinguish the role of HIFs as a major cellular molecular mediator in a low O₂ environment in these processes, we created mutant CD34⁺ cells silenced for HIF1 α and HIF2 α . We observed that HIFs, and particularly HIF2, are indispensable for the commitment of the multipotent hematopoietic progenitors to primitive erythroid lineage cells and their further expansion and differentiation (Figures 1–4). Additionally, we observed that BFU-Es obtained in culture propagated from CD34⁺ cells silenced for Hif1 and HIF2 are capable of multiplying. However, while in the shHIF1 condition, BFU-E are capable of converting to the CFU-E stage, and in the shHIF2 condition, the maturation is blocked at the BFU-E stage. This indicates that HIF1 and HIF2 have specific and complementary roles in early erythropoiesis.

Our findings are concordant with others showing the predominant role of HIF2 in adult hematopoiesis [35–39]. Thus, it was shown that the knockdown of HIF2 α and, to a much lesser extent, HIF-1 α impedes the long-term repopulating ability of human CB CD34⁺ cells and significantly diminishes their capacity to form erythroid colonies [27].

In contrast, HIF-mediated regulation comprises the regulation with other signaling pathways [40]. In addition to its role in the ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells [17,18,33], the activation of Notch signaling promotes their differentiation toward erythroid lineage [19,21,41]. Additionally, in vivo model using tamoxifen-inducible CreER knock-in mice for individual Notch receptors, in combination with a Notch reporter strain (Hes1GFP), showed the critical role of the Notch pathway in early hematopoiesis and in the commitment of hematopoietic progenitors toward erythroid lineage [24].

In our system, we used the protocol of ex vivo early erythropoiesis to show that juxtacrine Notch is activated due to homotypic interactions between Notch receptors and the Jagged-1 ligand in differentiating erythroid cells. In our model, Notch1 and Notch2 receptors are differently expressed; when both are present in multipotent hematopoietic progenitors, Notch2R expression increased, suggesting its dominant role in early erythroid development. This is coherent with other studies showing that its expression peaks in parallel with CFU-E and pro-erythroblast production and begins to decrease at the stage of basophilic erythroblasts [32,33].

In our model, Notch inhibition resulted in a slight but significant reduction in erythroid cell expansion, which was not associated with higher apoptosis but only with a diminution of cell division (Figure 2, supplementary Figures S1 and S2). Additionally, Notch inhibition resulted in approximately 50% \pm 15 of reduction in total cell number at 20% O₂ vs. approximately 30% \pm 13 detected at the same day point at 3% O₂. This is in agreement with the increase in the erythroid cell expansion and differentiation, detected at a physiological O₂ concentration with respect to 20% O₂ [2]. The reasons for this are associated with both the increased stabilization of HIF factors at a low O₂ concentration that exhibits favorable effects in the early erythropoiesis, and inversely a reduction in erythroid development provoked by hyperoxygenation at 20% O₂ [1,2]. The favorable effects of physiological O₂ concentration yield cells more resistant against Notch inhibition.

In addition, even the amplification of early erythroid progenitors was diminished, and the inhibition of Notch did not impair erythroid progenitor development from CD34⁺ multipotent progenitors and their development to precursors. This implicates that Notch activation in our model with early erythropoiesis ex vivo affects mostly the maintenance and amplification of the multipotent progenitors' (MPP, CMP, MEP) compartment and their

commitment toward the erythroid lineage progenitor. Furthermore, we noticed that the inhibition of the Notch pathway even promotes BFU-E to CFU-E commitment as well as increases the percentage of more mature GPA⁺ erythroid cells (Figure 3c, Figure S3a). Altogether, the effects of Notch inhibition reflect the implication in erythroid cell proliferation and delay the differentiation, as previously shown [33,42].

Ligand binding to the Notch receptor induces the receptor cleavage by ADAM metalloprotease, which forms Notch extracellular truncation. Then, the final cleavage is mediated by γ secretase, resulting in the release of the Notch intracellular domain (NotchICD) that translocates in the nucleus. It forms a trimeric complex with the transcriptional regulator protein CBF1–Suppressor of Hairless–LAG1 and the co-activator mastermind-like transcriptional co-activator1 in humans and stimulates the transcription of target genes [43].

Numerous experimental systems have revealed that the Notch/HIF interplay could be realized at the transcription level: HIF-mediated stabilization of NotchICD stabilization induces the expression of Notch target genes, and the signal triggering level: HIF induces the expression of Notch receptor and ligands [13]. Our results fit these findings: we observed that HIF1 α as well as HIF2 α are implicated in the Notch2R expression. In addition, NOTCH2ICD stabilization is abrogated when HIF1 α and HIF2 α are silenced, resulting in the reduction in the Hes target gene expression. Importantly, in our model, the inhibition of Notch/HIF interplay impairs the early erythroid development, suggesting its determining role in it.

It should be stressed, however, that we detected pronounced erythroid differentiation inhibition when HIF1 α and HIF2 α were silenced, giving rise to most of the expanded cells being non-erythroid at Day 8 (Figure S3c). Considering this decrease in the Notch2R expression in respect to NT condition could be the consequence of a rise in the expression of Notch2R associated with the development of other hematopoietic lineage (e.g., megakaryocyte progenitors) [24].

It should be noted that Notch signaling could potentiate HIF-mediated responses by acting as a molecular sink for FIH, or by favoring the expression of hypoxia-induced genes [44,45]. This should be taken into account when Notch/HIF interplay is considered.

We showed here that similar phenomena observed at 3%O₂ were detected at 20% O₂. This could be associated with the action of “hypoxia mimicking agents” (i.e., SCF) presented in the culture medium, which stabilize HIF even at a high O₂ [11]. However, the significant advantage in the erythroid expansion observed at 3% O₂ suggests that above Notch/HIF interplay, it comprises other signaling pathway implications or/and it is associated with erythroid cell oxidative status [2].

Altogether, our results give light to the early erythropoiesis regulatory network, giving way for the optimization of the protocol for the ex vivo erythropoiesis. The utilization of Notch ligands as well as HIF stabilizers (hypoxia mimicking agent) could be useful for improving the ex vivo erythroid culture

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12040540/s1>, Supplementary Figure S1: Cell survival; Supplementary Figure S2: Tracking cell division history by CFSE staining; Supplementary Figure S3: Distribution of cellular types in time-course of erythroid culture; Figure S4: Expression of Notch ligand Jagged-1; Table S1: Real-time polymerase chain reaction primers.

Author Contributions: Conceptualization, M.V.-L.; Methodology and experimental work, V.L., E.N.v.T.d.B., A.R., L.R., M.A. and C.D.; Data analysis, M.V.-L., M.H.; Writing—original draft preparation, M.V.-L.; Writing—review and editing, Z.I. and P.B.d.l.G.; Supervision, M.V.-L.; Project administration, M.V.-L.; Funding acquisition, M.V.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was supported by the annual research budget of EFS-NVAQ.

Institutional Review Board Statement: The use of human cells for the purpose of scientific research in our laboratory was approved by the Ministry of Education and Research of the French Republic

in compliance with the regulatory procedures that apply (DC 2013-1998, DC 2018-3143 519 and DC 2019-3713).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects whose cells were involved in the study, in compliance with all regulatory procedures that apply and Ministry of Education authorizations (DC 2018-3143 and DC 2019-3713).

Data Availability Statement: All data are conserved in the internal server of EFS-NVAQ Bordeaux and are available upon request.

Acknowledgments: We are grateful to Elisabeth Doutreloux-Volkmann (EFS NVAQ, Bordeaux) for the language corrections. We highly appreciate the vectorology facility Vect'UB University of Bordeaux, the scientific director, François Moreau-Gaudry and technical executive, Mme Véronique Guyonnet-Dupérat. We thank Atika Zouine and Vincent Pitard for technical assistance at the flow cytometry facility, TBMCORE platform in Bordeaux University CNRS UMS 3427, INSERM US 005, Univ. Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France.

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

References

1. Ivanovic, Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J. Cell. Physiol.* **2009**, *219*, 271–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Vlaski, M.; Lafarge, X.; Chevalere, J.; Duchez, P.; Boiron, J.-M.; Ivanovic, Z. Low oxygen concentration as a general physiologic regulator of erythropoiesis beyond the EPO-related downstream tuning and a tool for the optimization of red blood cell production ex vivo. *Exp. Hematol.* **2009**, *37*, 573–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Bradley, T.R.; Hodgson, G.S.; Rosendaal, M. The effect of oxygen tension on haemopoietic and fibroblast cell proliferation in vitro. *J. Cell. Physiol.* **1978**, *97*, 517–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lu, L.; Broxmeyer, H.E. Comparative influences of phytohemagglutinin-stimulated leukocyte conditioned medium, hemin, prostaglandin E, and low oxygen tension on colony formation by erythroid progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp. Hematol.* **1985**, *13*, 989–993.
5. Koller, M.R.; Bender, J.G.; Papoutsakis, E.T.; Miller, W.M. Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen, and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors. *Blood* **1992**, *80*, 403–411. [[CrossRef](#)]
6. Ivanović, Z.; Bartolozzi, B.; Bernabei, P.A.; Cipolleschi, M.G.; Rovida, E.; Milenković, P.; Praloran, V.; Sbarba, P.D. Incubation of murine bone marrow cells in hypoxia ensures the maintenance of marrow-repopulating ability together with the expansion of committed progenitors. *Br. J. Haematol.* **2000**, *108*, 424–429. [[CrossRef](#)]
7. Cipolleschi, M.G.; D'Ippolito, G.; Bernabei, P.A.; Caporale, R.; Nannini, R.; Mariani, M.; Fabbiani, M.; Rossi-Ferrini, P.; Olivetto, M.; Sbarba, P.D. Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E in vitro. *Exp. Hematol.* **1997**, *25*, 1187–1194.
8. Rich, I.N.; Kubanek, B. The effect of reduced oxygen tension on colony formation of erythropoietic cells in vitro. *Br. J. Haematol.* **1982**, *52*, 579–588. [[CrossRef](#)]
9. Pennathur-Das, R.; Levitt, L. Augmentation of in vitro human marrow erythropoiesis under physiological oxygen tensions is mediated by monocytes and T lymphocytes. *Blood* **1987**, *69*, 899–907. [[CrossRef](#)]
10. Schofield, C.; Ratcliffe, P. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 343–354. [[CrossRef](#)]
11. Pedersen, M.; Löfstedt, T.; Sun, J.; Holmquist-Mengelbier, L.; Pahlman, S.; Rönstrand, L. Stem cell factor induces HIF-1 α at normoxia in hematopoietic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *377*, 98–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Semenza, G.L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 167–171. [[CrossRef](#)]
13. Landor, S.K.-J.; Lendahl, U. The interplay between the cellular hypoxic response and Notch signaling. *Exp. Cell Res.* **2017**, *356*, 146–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Depping, R.; Jelkmann, W.; Kosyna, F.K. Nuclear-cytoplasmic shuttling of proteins in control of cellular oxygen sensing. *Klin. Wochenschr.* **2015**, *93*, 599–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Luo, J.C.; Shibuya, M. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1 α , 2 α and 3 α). *Oncogene* **2001**, *20*, 1435–1444. [[CrossRef](#)]
16. Kojika, S.; Griffin, J.D. Notch receptors and hematopoiesis. *Exp. Hematol.* **2001**, *29*, 1041–1052. [[CrossRef](#)]
17. Duncan, A.W.; Rattis, F.M.; Dimascio, L.N.; Congdon, K.L.; Pazianos, G.; Zhao, C.; Yoon, K.; Cook, J.M.; Willert, K.; Gaiano, N.; et al. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 314–322. [[CrossRef](#)]
18. Araki, D.; Fu, J.F.; Huntsman, H.; Cordes, S.; Seifuddin, F.; Alvarado, L.J.; Cheruku, P.S.; Cash, A.; Traba, J.; Li, Y.; et al. NOTCH-mediated ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells by culture under hypoxia. *Stem Cell Rep.* **2021**, *16*, 2336–2350. [[CrossRef](#)]
19. Sugimoto, A.; Yamamoto, M.; Suzuki, M.; Inoue, T.; Nakamura, S.; Motoda, R.; Yamasaki, F.; Orita, K. Delta-4 Notch ligand promotes erythroid differentiation of human umbilical cord blood CD34+ cells. *Exp. Hematol.* **2006**, *34*, 424–432. [[CrossRef](#)]

20. Dando, J.S.; Tavian, M.; Catelain, C.; Poirault, S.; Bennaceur-Griscelli, A.; Sainteny, F.; Vainchenker, W.; Péault, B.; Lauret, E. Notch/Delta4 Interaction in Human Embryonic Liver CD34+ CD38− Cells: Positive Influence on BFU-E Production and LTC-IC Potential Maintenance. *Stem Cells* **2005**, *23*, 550–560. [[CrossRef](#)]
21. Walker, L.; Lynch, M.; Silverman, S.; Fraser, J.; Boulter, J.; Weinmaster, G.; Gasson, J.C. The Notch/Jagged Pathway Inhibits Proliferation of Human Hematopoietic Progenitors In Vitro. *Stem Cells* **1999**, *17*, 162–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Tachikawa, Y.; Matsushima, T.; Abe, Y.; Sakano, S.; Yamamoto, M.; Nishimura, J.; Nawata, H.; Takayanagi, R.; Muta, K. Pivotal role of Notch signaling in regulation of erythroid maturation and proliferation. *Eur. J. Haematol.* **2006**, *77*, 273–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Diez, H.; Fischer, A.; Winkler, A.; Hu, C.-J.; Hatzopoulos, A.K.; Breier, G.; Gessler, M. Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Oh, P.; Lobry, C.; Gao, J.; Tikhonova, A.; Loizou, E.; Manent, J.; van Handel, B.; Ibrahim, S.; Greve, J.; Mikkola, H.; et al. In Vivo Mapping of Notch Pathway Activity in Normal and Stress Hematopoiesis. *Cell Stem Cell* **2013**, *13*, 190–204. [[CrossRef](#)]
25. Walker, L.; Carlson, A.; Tan-Pertel, H.T.; Weinmaster, G.; Gasson, J. The Notch Receptor and Its Ligands Are Selectively Expressed During Hematopoietic Development in the Mouse. *Stem Cells* **2001**, *19*, 543–552. [[CrossRef](#)]
26. Ivanovic, Z.; Hermitte, F.; de la Grange, P.B.; Dazey, B.; Belloc, F.; Lacombe, F.; Vezon, G.; Praloran, V. Simultaneous Maintenance of Human Cord Blood SCID-Repopulating Cells and Expansion of Committed Progenitors at Low O₂ Concentration (3%). *Stem Cells* **2004**, *22*, 716–724. [[CrossRef](#)]
27. Rouault-Pierre, K.; Onieva, L.L.; Foster, K.; Afonso, F.D.A.; Lamrissi-Garcia, I.; Sanchez, M.S.; Mitter, R.; Ivanovic, Z.; de Verneuil, H.; Gribben, J.; et al. HIF-2 α Protects Human Hematopoietic Stem/Progenitors and Acute Myeloid Leukemic Cells from Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Stem Cell* **2013**, *13*, 549–563. [[CrossRef](#)]
28. Giarratana, M.-C.; Kobari, L.; Lapillonne, H.; Chalmers, D.J.; Kiger, L.; Cynober, T.; Marden, M.C.; Wajcman, H.; Douay, L. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 69–74. [[CrossRef](#)]
29. Bony, V.; Gane, P.; Bailly, P.; Cartron, J.-P. Time-course expression of polypeptides carrying blood group antigens during human erythroid differentiation. *Br. J. Haematol.* **1999**, *107*, 263–274. [[CrossRef](#)]
30. Guitart, A.V.; Debeissat, C.; Hermitte, F.; Villacreces, A.; Ivanovic, Z.; Boeuf, H.; Praloran, V. Very low oxygen concentration (0.1%) reveals two FDCP-Mix cell subpopulations that differ by their cell cycling, differentiation and p27KIP1 expression. *Cell Death Differ.* **2010**, *18*, 174–182. [[CrossRef](#)]
31. Crowley, L.C.; Scott, A.P.; Marfell, B.J.; Boughaba, J.A.; Chojnowski, G.; Waterhouse, N.J. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *7*, pdb-prot087163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Singh, N.; Phillips, R.A.; Iscove, N.N.; Egan, S.E. Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis. *Exp. Hematol.* **2000**, *28*, 527–534. [[CrossRef](#)]
33. Zeuner, A.; Francescangeli, F.; Signore, M.; Venneri, M.A.; Pedini, F.; Felli, N.; Pagliuca, A.; Conticello, C.; De Maria, R. The Notch2–Jagged1 interaction mediates stem cell factor signaling in erythropoiesis. *Cell Death Differ.* **2010**, *18*, 371–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hattangadi, S.M.; Wong, P.; Zhang, L.; Flygare, J.; Lodish, H.F. From stem cell to red cell: Regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood* **2011**, *118*, 6258–6268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Scortegagna, M.; Morris, M.A.; Oktay, Y.; Bennett, M.; Garcia, J.A. The HIF family member EPAS1/HIF-2 α is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood* **2003**, *102*, 1634–1640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gruber, M.; Hu, C.-J.; Johnson, R.S.; Brown, E.J.; Keith, B.; Simon, M.C. Acute postnatal ablation of *Hif-2* α results in anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2301–2306. [[CrossRef](#)]
37. Rankin, E.; Biju, M.P.; Liu, Q.; Unger, T.L.; Rha, J.; Johnson, R.; Simon, M.C.; Keith, B.; Haase, V.H. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1068–1077. [[CrossRef](#)]
38. Warnecke, C.; Zaborowska, Z.; Kurreck, J.; Erdmann, V.A.; Frei, U.; Wiesener, M.; Eckardt, K. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference: Erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1462–1464. [[CrossRef](#)]
39. Ratcliffe, P.J. HIF-1 and HIF-2: Working alone or together in hypoxia? *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 862–865. [[CrossRef](#)]
40. Gustafsson, M.V.; Zheng, X.; Pereira, T.; Gradin, K.; Jin, S.; Lundkvist, J.; Ruas, J.; Poellinger, L.; Lendahl, U.; Bondesson, M. Hypoxia Requires Notch Signaling to Maintain the Undifferentiated Cell State. *Dev. Cell* **2005**, *9*, 617–628. [[CrossRef](#)]
41. Henning, K.; Heering, J.; Schwanbeck, R.; Schroeder, T.; Helmbold, H.; Schäfer, H.; Deppert, W.; Kim, E.; Just, U. Notch1 activation reduces proliferation in the multipotent hematopoietic progenitor cell line FDCP-mix through a p53-dependent pathway but Notch1 effects on myeloid and erythroid differentiation are independent of p53. *Cell Death Differ.* **2007**, *15*, 398–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Myllymäki, M.N.M.; Määttä, J.; Dimova, E.Y.; Izzi, V.; Väisänen, T.; Myllyharju, J.; Koivunen, P.; Serpi, R. Notch Downregulation and Extramedullary Erythrocytosis in Hypoxia-Inducible Factor Prolyl 4-Hydroxylase 2-Deficient Mice. *Mol. Cell. Biol.* **2017**, *37*, e00529-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Bray, S. Notch signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 722–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Zheng, X.; Linke, S.; Dias, J.M.; Zheng, X.; Gradin, K.; Wallis, T.P.; Hamilton, B.R.; Gustafsson, M.; Ruas, J.L.; Wilkins, S.; et al. Interaction with factor inhibiting HIF-1 defines an additional mode of cross-coupling between the Notch and hypoxia signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3368–3373. [[CrossRef](#)]
45. Main, H.; Lee, K.L.; Yang, H.; Haapa-Paananen, S.; Edgren, H.; Jin, S.; Sahlgren, C.; Kallioniemi, O.; Poellinger, L.; Lim, B.; et al. Interactions between Notch- and hypoxia-induced transcriptomes in embryonic stem cells. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 1610–1624. [[CrossRef](#)]

MEETING REPORT

Meeting report of the 4th biennial Metabolism and Cancer symposium

Nadine Abdel Hadi¹, Emeline Boet^{2,3}, Airelle Lahalle^{4,5}, Laura Lauture^{2,3}, Alice Refeyton⁶, Gabriela Reyes-Castellanos¹, Nathalie Caplet⁷, Alice Carrier¹, Laurent Le Cam^{4,5}, Nathalie M. Mazure⁸, Jean-Ehrland Ricci^{8,9} , Stéphane Rocchi⁸, Jean-Emmanuel Sarry^{2,3}, Sophie Vasseur¹, Marija Vlaski-Lafarge⁶, Rodrigue Rossignol¹⁰ and Frédéric Bost⁸ 

1 Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Unité 1068, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut Paoli-Calmettes (IPC), Unité Mixte de Recherche (UMR 7258), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Aix-Marseille, Marseille, France

2 Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Toulouse, Toulouse, France

3 Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer 2018, Toulouse, France

4 Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Institut Régional du Cancer de Montpellier, INSERM, Université de Montpellier, Montpellier, France

5 Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Paris, France

6 Département de Recherche, Établissement Français du Sang Nouvelle Aquitaine, Unité 1035 Inserm, Bordeaux, France

7 BRIO (Bordeaux Recherche Intégrée en Oncologie), Bordeaux, France

8 INSERM U1065, C3M, Université Côte d'Azur (UCA), Nice, France

9 Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer, Nice, France

10 CELLOMET, INSERM U1211, Bordeaux University, Bordeaux, France

Keywords

cancer; epigenetics; hypoxia; metabolism; mitochondria; redox; signaling

Correspondence

F. Bost, Université Côte d'Azur (UCA),
INSERM U1065, C3M, F-06204 Nice,
France
Tel: +33 489153815
E-mail: bost@unice.fr

Nadine Abdel Hadi, Emeline Boet, Airelle Lahalle, Laura Lauture, Alice Refeyton and Gabriela Reyes-Castellanos contributed

The 4th International meeting Metabolism and Cancer initially programmed to take place in Bordeaux (France) was held virtually on May 27–29, 2021. The three-day event was followed by around 600 participants daily from 47 countries around the world. The meeting hosted 21 speakers including selected talks and a keynote lecture from the Nobel Prize winner Sir Peter J. Ratcliffe (Oxford, UK). Presentations and discussions were divided in four scientific sessions: (a) Redox and energy metabolism (b) Redox and hypoxia (c) Metabolic profiling and epigenetic control and (d) Signalling, fuelling and metabolism in cancer and a general public session on cancer and nutrition. This report summarises the presentations and outcomes of the 4th annual Metabolism and Cancer symposium. We provide here a summary of the scientific highlights of this exciting meeting.

Abbreviations

2-OG, 2-oxoglutarate; 5hmC, 5-hydroxymethylcytosine; AcCoA, AcetylCoenzymeA; ADO, cysteamine (2-aminoethanethiol) dioxygenase; alt-NHEJ, alternative nonhomologous end joining repair; *BRCA1*, *BRCA2*, breast cancer-associated genes 1 and 2; ChREBP, carbohydrate responsive element binding protein; CML, chronic myeloid leukaemia; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; ETC, electron transport chain; FAO, fatty acid oxidation; HBP, hexosamine biosynthetic pathway; HCC, hepatocarcinoma; HIF, hypoxia-inducible factor; HR, homologous recombination; HSC, haematopoietic stem cell; IR, ischaemia-reperfusion; KEC, kidney epithelial cells; LSC, leukemic stem cells; m3C, 3-Methylcytidine; METTL5, METTL6, methyltransferase like 5 and 6; MG, methylglyoxal; MRD, minimal residual disease; NAC, N-AcetylCysteine; OGA, O-GlcNAcase; OGT, O-GlcNAc transferase; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; PDAC, Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma; PDCLs, patient derived cell lines; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; PHDs, prolyl-hydroxylases; PHGDH, phosphoglycerate dehydrogenase; PPAR Δ , Proliferator-activated Receptor Delta; PPGL, pheochromocytoma and paraganglioma; RET, reverse electron transport; ROS, reactive oxygen species; SAM, S-adenosyl-methionine; SDH, succinate dehydrogenase; TAM, tumour-associated macrophage; TCA, tricarboxylic acid; TET, ten-eleven translocation; TFAM, mitochondrial transcription factor A; TKi, tyrosine kinase inhibitors; TNBC, triple negative breast cancer; TPZ, tirapazamine.

equally to the work
Rodrigue Rossignol and Frédéric Bost are
co-senior authors

(Received 5 October 2021, revised 18
November 2021, accepted 23 November
2021)

doi:10.1111/febs.16295

Introduction

Initially programed in Bordeaux, the biennial meeting was finally virtual because of the COVID-19 pandemic. Whereas the first two days were dedicated to scientific presentations, the third day was devoted to a general public on the theme Cancer and nutrition. Organised in close collaboration with the French network on nutrition and cancer (NACRe). During the two last decades multiple metabolic targets have been identified in cancer cells, it is now time to go forward with the clinical applications. The speakers envisioned the future therapeutic applications of targeting cancer cell metabolism. Here, we provide a summary of their presentations during which many new findings in the field of metabolism and cancer were highlighted, with a strong focus on redox and mitochondrial metabolism and hypoxia. A replay of the main sessions is available upon free registration @ <https://www.metabolism-cancer.com/>

SESSION I: Redox and energy metabolism

Mitochondrial redox metabolism: friend or foe?

In this session, the speakers illustrated how changes in mitochondrial redox metabolism are implicated in human pathologies, including cardiovascular diseases and different types of cancer, and how these alterations represent potential new targets for the development of new therapies.

‘Mitochondria are the heart of the cell’, said Mike Murphy (University of Cambridge, UK), during the presentation of his work which aims at deciphering the impact of mitochondrial oxidative damage in human pathologies. Dr. Murphy discussed the role of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) in the pathology of ischaemia-reperfusion (IR) injury, which occurs mainly during stroke and heart attack. Even if reperfusion of ischaemic tissues is necessary

to maintain cell viability, it comes with a price to pay in terms of oxidative damage. To further address this clinically important question, Murphy and collaborators developed a comparative *in vivo* and *ex vivo* metabolomics approach in different tissues (i.e. heart, liver, brain, and kidney). This approach demonstrated that succinate is the only tricarboxylic acid (TCA) cycle metabolite accumulating during ischaemia and more importantly, it is responsible for mitochondrial ROS production during reperfusion [1,2]. Further investigations revealed that the accumulated succinate during ischaemia is highly re-oxidised by succinate dehydrogenase, leading to extensive ROS production from reverse electron transport (RET) at mitochondrial complex I [1,2]. Murphy then raised the following question: ‘why does succinate accumulation/oxidation happen?’ The answer is that it is not fortuitous. Indeed, pro-inflammatory macrophages reprogram their mitochondria to sustain a high membrane potential, leading to a decrease in the levels of ATP production and an increase in the generation of ROS/succinate, a process that promotes glycolysis to maintain ATP production [3]. To challenge their hypothesis *in vivo*, Murphy and collaborators used mice harbouring a ND6-P25L mutation that leads to functional mitochondria, but which are impaired for ROS production by RET. They observed that ND6-P25L mice are protected against cardiac IR injury, fully demonstrating the pathological role of mitochondrial ROS production by RET through complex I during reperfusion [4]. These data suggest that succinate is a marker of ischaemia and a good proxy to assess mitochondrial status. More importantly, Murphy and colleagues show that the inhibition of succinate accumulation by malonate is an efficient strategy to protect cardiomyocytes against IR injury.

When it comes to anticancer therapeutic strategies, non-apoptotic mechanisms of cell death such as ferroptosis represent promising strategies. Ferroptosis is

an iron-dependent non-apoptotic cell death mechanism characterised by the accumulation of lipid peroxides and loss of membrane integrity. Dr Milica Vucetic (Centre Scientifique de Monaco, Monte-Carlo, Monaco) highlighted the importance of cysteine-starvation as a potent inducer of ferroptosis in Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma (PDAC) cells. More specifically, Dr Vucetic proposed the targeting of the cysteine transporter xCT. Indeed, genetic invalidation of xCT in MIA PaCa-2 and Capan-2 cells sensitizes them to ferroptotic cell death, which was fully prevented via N-Acetylcysteine (NAC) or lipophilic antioxidants (vitamin E) [5]. *In vivo*, tumour growth of xCT-KO cells xenografts was delayed but not suppressed. Dr Vucetic explained that xCT plays its fundamental role in cyst(e)ine import exclusively or almost exclusively in an oxidised form (*in vitro* conditions), and that *in vivo*, cysteine-reduced form can come from different sources. Interestingly, this work demonstrated that neighbouring fibroblasts secrete small 'rescue agents' for the xCT-KO tumours allowing the complete prevention of ferroptosis [6].

In conclusion, Milica Vucetic and collaborators show that the cysteine transporter xCT is a potential target for treating pancreatic cancer; nevertheless, their findings suggest that xCT inhibition has to be achieved systematically in order to avoid cell-to-cell interplay.

Redox regulation has been proposed to control various aspects of carcinogenesis, cancer cell growth, metabolism, migration, invasion, and metastasis. As cancer has many faces, the role of redox control in different cancers and in the numerous cancer-related processes often points to different directions. Holly Brunton (CRUK Beatson, Glasgow, UK) in a selected talk focussed on Selenocysteine, a cysteine analogue that is more efficient at 'mopping up' free radicals. Selenocysteine has a structure similar to cysteine, but with an atom of selenium replace the sulphur. Proteins which contain a selenocysteine residue are called selenoproteins. Holly Brunton and collaborators interrogate the transcriptome and metabolome of 48 novel pancreatic cancer patient derived cell lines (PDCLs) to define mechanisms of resistance to GSK3 β inhibition using a GSK3 β inhibitor (9-ING-41) with antitumour activity. They observed that redox metabolites increase following targeted therapy in PDAC. RNA-seq analysis of resistant PDCLs showed that selenocysteine metabolism is significantly altered in resistant PDCLs. After prolonged inhibitor treatment, they observed an increase in *PSTK* and *SEPSECS* expression, encoding the two kinases implicated in selenoprotein translation. When cells are grown in the absence of selenium, translation of selenoproteins terminates at the UGA stop codon, resulting in a truncated non-functional

enzyme, suggesting that to increase translation of ROS-clearing proteins, a cell will require an increased supply of selenium. In conclusion, Brunton and collaborators suggest that targeting selenoprotein translation will reduce the cellular capacity to manage ROS and resensitize PDAC tumours to targeted therapy.

Pierre Sonveaux (UC Louvain, Leuven, Belgium) hypothesised that cancer metastasis is driven, at least partly, by metabolic alterations. Although aerobic glycolysis is known to promote metastasis, Sonveaux and collaborators identified a different switch primarily affecting mitochondria. This switch involves overload of the electron transport chain (ETC) with preserved mitochondrial functions but increased mitochondrial superoxide production [7]. Experimentally, Sonveaux successfully selected super-invasive (*in vitro*) and super-metastatic (*in vivo*) cells. Interestingly, the *in vitro* selection did not induce a glycolytic switch (on contrary to the well-recognised avidity for glucose of metastatic tumours) or lactate production. Moreover, the super-metastatic tumour cells acquired giant mitochondria with higher cristae number and a mitochondrial overload. Of major importance, this mitochondrial overload correlates with tumour metastasis and consistently, moderate Complex I inhibition promoted mitochondrial ROS-dependent tumour cell migration. Moreover, mitochondria controlled spontaneous metastatic dissemination of B16F10 mouse melanoma and triple-negative MDA-MB-231 human breast cancer (TNBC) cells in xenograft models. Finally, this group introduced 'mitoQ', a compound inhibiting TNBC recurrence and spontaneous metastasis in mice, placing it as a potential promising drug to prevent metastasis.

Mitochondrial respiration [oxidative phosphorylation, (OXPHOS)] is an emerging target in currently refractory cancers such PDAC. However, the variability of energetic metabolic adaptations among PDAC patients has not been fully investigated. In a selected talk, Nadine Abdel Hadi (Marseille, France) demonstrated that OXPHOS rates are highly heterogeneous in PDAC patients, and that high OXPHOS tumours are enriched in mitochondrial respiratory complex I at both the protein and mRNA levels. Furthermore, phenformin, a mitochondrial complex I inhibitor, has a synergistic effect when combined with Gemcitabine in high-OXPHOS tumours in orthotopic mouse xenograft models [8]. Abdel Hadi showed that PDAC cells depend on fatty acids as an energy source to feed mitochondrial respiration and identified fatty acid oxidation (FAO) as a novel vulnerability of this highly aggressive cancer. Then, she asked whether Perhexiline, a FAO inhibitor, can amplify the antitumoural

activity of Gemcitabine in PDAC tumours. Combining Gemcitabine and Perhexiline induced complete tumour regression in PDAC xenografts, although relapse was still observed after long term treatment due to metabolic adaptations of persistent cells. This work showed that relapsed PDAC tumours result from the proliferation of persistent cells (also called residual) which survived after therapy-induced regression, through the establishment of metabolic adaptations in particular modifications of redox metabolism. This supports the strategy of treating the minimal residual pancreatic disease with drugs that increase ROS levels to reach a ROS concentration promoting cell death to prevent the relapse.

SESSION II: Redox and hypoxia

The meeting hosted the Nobel Prize laureate Sir Peter Ratcliffe (Ludwig Institute for Cancer Research, University of Oxford and the Francis Crick Institute, London, UK) who gave a keynote lecture on our understanding on oxygen sensing by metazoan and its implication in cancer and therapeutics. The hypoxia-inducible factor (HIF) transcription factor plays a central role in hypoxia [9]. Under normoxic conditions (21% O₂), the alpha subunit of HIF (HIF α) is hydroxylated at conserved proline residues by 2-oxoglutarate-dependent oxygenase, HIF prolylhydroxylases (PHDs), allowing its recognition and ubiquitination by the E3 ubiquitin ligase VHL, which labels it for rapid degradation by the proteasome. Under low oxygen conditions, or in cells lacking functional pVHL, HIF α accumulates, dimerises with an HIF β family member, translocates to the nucleus, and transcriptionally regulates genes involved in erythropoiesis, angiogenesis, autophagy, and energy metabolism. Genomic analyses revealed at least one isoform of each component of the HIF-PHD-VHL triad in each animal species. Most primitive invertebrates possess a single set of proteins, with multiple isoforms arising through gene duplication events at the basis of vertebrate evolution. Substrate repertoire analysis revealed that PHDs mainly target HIF [10]. It becomes clear that all four eukaryotic kingdoms use different types of protein oxidation coupled to proteolysis and to oxygen levels [11]. For example, oxygen sensing system in plants is based on cystein oxidation [12]. Ratcliffe *et al.* identified a protein cysteamine (2-aminoethanethiol) dioxygenase (ADO) in human cells that is the human ortholog of the plant cystein oxidase mediating responses to hypoxia [13]. In cancer, oxygen-sensing pathways are dysregulated, both by oncogenic mutations and by micro-environmental hypoxic conditions

that occur in most solid tumours. In renal cell carcinomas, constitutive activation of HIF results from inactivating mutations of the VHL tumour suppressor, and this leads to stabilisation of high levels of HIF even in well-oxygenated cells. In this situation, the switch of interconnected hypoxia pathways is predicted to generate antitumourigenic as well as pro-tumourigenic effects [14]. In this way, un-physiological activation of interconnected pathways in cancer, as exemplified by HIF, promote selective mechanisms that drive escape mechanisms and fuel the flexibility and heterogeneity to enable many tumours to avoid chemotherapeutic eradication [15].

Hypoxia resistance in tumours was further discussed by Amato Giaccia (Oxford Institute for Radiation Oncology, University of Oxford, UK) who investigated the implication of hypoxia in breast cancer resistance to Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. The breast cancer-associated genes 1 and 2 (*BRCA1*, *BRCA2*) proteins play a central role in the repair of double-strand DNA breaks via homologous recombination (HR). Because cells that are deficient in *BRCA1* or *BRCA2* display impaired HR and an inability to repair defective chromosomes [16]. This defect makes BRCA-deficient tumours good candidates for therapies based on PARP inhibitors. PARP binds to damaged DNA through its zinc finger domain and helps the altered structure to become more organised and accessible to critical co-factors that are essential for its activity. PARP inhibitors (PARPi) trap PARP proteins on DNA and block their catalytic action. This interferes with replication, causing cell death preferentially in cancer cells due to their high replication rate. It was showed that severe hypoxia (<0.5% O₂) compromises HR and synergizes with PARPi in HR proficient cells causing cell death [17]. However, Giaccia's group found that in moderate hypoxia (2% O₂) HR-deficient as well as HR-proficient tumours are resistant to PARPi therapy [18]. This was due neither to a loss of PARP activity nor to a non-response to PARPi, suggesting that drug resistance in these tumours is linked to hypoxia. In contrast, PARPi in combination with inhibitors of alternative nonhomologous end joining repair (alt-NHEJ) enzymes resulted in increased cytotoxic double-strain breaks and cell death under normoxic conditions. Giaccia's group raised the hypothesis that the mechanism of resistance was associated with reduction of ROS-induced DNA damage in hypoxia. Their work demonstrates that synthetic lethality and PARPi efficacy can be restored in hypoxic HR-deficient cancer cells resistant to PARPi, through the addition of a ROS-generating hypoxia-activated cytotoxin such as tirapazamine (TPZ).

Therefore, Giaccia's group proposes the use of TPZ and other hypoxic cytotoxins in combination with PARPi-based therapy in future clinical trials for treatment of hypoxic tumours that are unresponsive to PARPi therapy alone [19].

The critical role of HIF-1 for the evolution of prostatic precancer lesions into fully malignant tumours was discussed by Mohamed Abu El Maaty (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire University of Strasbourg, France). He utilized genetically engineered mouse models in which the tumour suppressor Pten is selectively deleted (Pten(i)pe^{-/-} mice) in prostate using a Cre driver based on the probasin promoter. Single cell level analyses revealed the presence of immunosuppressive myeloid-derived cells, T lymphocytes and stromal fibroblastic but also luminal C cells expressing stem cells markers. Activation of HIF α signalling during disease progression was also observed. To study the role of HIF1 α in prostate carcinogenesis, Abu El Maaty then generated Pten/Hif α (i)pe^{-/-} mice in which both Pten and Hif α were selectively invalidated in prostate luminal epithelial cells at adulthood. This model revealed that HIF1 α promotes progression of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), as well as the development of poorly differentiated tumours. Single-cell characterisation of prostates isolated from Pten/Hif α (i)pe^{-/-} mice at 3 months of age demonstrated the downregulation of glucose-metabolizing networks and modulation of senescence-associated secretory phenotype in luminal cells. These effects led to a stimulation of immune surveillance in prostate, characterised by a reduction in the infiltration of myeloid-derived suppressor cells and increased levels of CD8+T-lymphocytes and natural killer cells, leading to apoptosis. Furthermore, expression of the pluripotency and plasticity factors Sox2 and Ezh2 was lower in Pten/Hif α (i)pe^{-/-} cells compared to Pten(i)pe^{-/-} cells, and epithelial cells with HIF α ablation displayed reduced organoid formation capacity. Also, expression of several chemokines (CXCL2, CXCL5 and CXCL17) with the stimulating cytokine IL12 a functional stimulator of CD8+ T lymphocytes were detected. Altogether, these results confirmed that HIF α signalling is a key driver of PIN progression by promoting cell-intrinsic and-extrinsic pro-tumoural pathways.

The relation between hypoxia and its role in promoting stemness in cancer cells was finally discussed by Persio Dello Sbarba (Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali, University of Florence, Italy) who presented the role of hypoxia in the selection and maintenance of leukemic stem cells (LSCs). Chronic myeloid leukaemia (CML) is a haematopoietic stem

cell-driven neoplasia characterised by expression of the constitutively active tyrosine kinase BCR/Abl. Dello Sbarba's group found that incubating CML cells in low oxygen decreases BCR/Abl protein, but not BCR/Abl mRNA levels, in a time-dependent manner. Under these conditions, stem cell potential is maintained independently of BCR/Abl signalling and a LSC subset is still present together with a remaining leukemic gene signature. Because of the decreased expression of their molecular target, LSC are refractory to tyrosine kinase inhibitors (TKi), which are used to target BCR/Abl in CML therapies. However, in this heterogeneous population, a subset of cells maintaining BCR/Abl expression (referred to as 'BCR/Abl-positive') display LSC properties. In contrast, CML cells incubated in standard atmosphere (20% O₂) with a TKi (Imatinib) exhibit marked reduced viability [20]. Based on these results, Dello Sbarba proposed that BCR/Abl-positive LSC ('LSC in progenitor cells') drive the expansion of leukemic cell populations, whereas BCR/Abl-negative LSC ('LSC in stem cells') are responsible for the long-term maintenance of therapy-resistant cells during the minimal residual disease (MRD) phase of CML. An initial characterisation of metabolic mechanisms driving BCR/Abl protein suppression showed that it occurs when the glucose concentration is closed to complete exhaustion but reappeared when glucose concentration increased. Thus, Dello Sbarba's group revealed a new mechanism of resistance of CML cells to TKi based on the reversible expression of the BCR/Abl protein depending on local substrate availability in low oxygen stem cell niche [21]. In SCN zones where glucose is available BCR/Abl expression would predispose CML cells to clonal expansion, whereas zones under glucose shortage would host cells adapted to persist independently of BCR/Abl signalling and thus representing a reservoir of treatment-resistant MRD. According to this model, a relapse of disease would occur when BCR/Abl-negative LSC adapted to energy shortage, following the establishment of permissive conditions (restored glucose supply), are induced to turn into or generate BCR/Abl-positive LSC capable to sustain clonal expansion [22].

SESSION III: Metabolic profiling and epigenetic control

The molecular consequences of cancer cell metabolic reprogramming are not yet fully understood. It is well recognised that some of the metabolites abnormally produced or consumed by cancer cells serve as essential cofactors by DNA or RNA modifying enzymes. This session focussed on studies aiming at further

understanding the complex connections between metabolism and the epigenome or the epitranscriptome. The intricate links between metabolism and DNA methylation or histone modifications have been thoroughly investigated in the past decades and several speakers of the meeting, including Dr. Judith Favier (INSERM, Paris University), Dr. Robert Schneider (Institute of functional epigenetics, Munich University) and Assia Tiamou (GIGA, Liege University) contributed to this field through their original findings.

Dr. Favier's laboratory is trying to understand the mechanisms by which mutations in genes encoding subunits of the succinate dehydrogenase (SDH) promote pheochromocytoma and paraganglioma development, two rare neuroendocrine tumours arising in the adrenal medulla and the parasympathetic or sympathetic nervous systems, respectively. The SDH enzyme is a multi-subunit complex of the TCA cycle that converts succinate to fumarate. A mutation of any subunit of the SDH complex leads to the accumulation of succinate, an oncometabolite, which inhibits 2-oxoglutarate (2-OG)-dependent dioxygenases. Succinate-mediated inhibition of several of these enzymes has been proposed to contribute to oncogenesis, including prolyl-PHDs that are necessary for the degradation of the HIFs, the ten-eleven translocation (TET) enzymes that hydroxylate 5-methylcytosine into 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), as well as members of the Jumonji (JmjC) family of lysine demethylases. These defects were proposed to lead to a pseudohypoxic state and a hypermethylation phenotype observed in the most aggressive forms of SDH-deficient tumours. However, their relative contribution to cancer progression was still debated. Another unsolved question in that field relates to the much worse prognosis of patients with SDHB-mutated tumours compared to those harbouring mutations in other subunits of the SDH complex. Consistent with these clinical observations, SDHB-mutated cells are more invasive and display features linked to the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). Using genetic approaches, this laboratory elegantly demonstrated that inhibition of the TET1/2 enzymes was sufficient to recapitulate the DNA hypermethylation phenotype of SDHB-mutated cells but failed to increase their invasive capacity. Strikingly, culturing TET1/2-deficient, but not control cells in mild hypoxic conditions induced a mesenchymal-like phenotype comparable to that of SDHB deficient cells. These data support a model where the epigenetic reprogramming induced by TET1/2 inhibition primes these cells to HIF2-mediated induction of an EMT, a process which increases their metastatic potential. Interestingly, Favier's laboratory also recently identified a new mechanism involved in the regulation of

iron metabolism which participates in the reprogramming of SDHB-deficient cells. SDHB is an iron-sulphur cluster containing protein and its inhibition leads to decreased mitochondrial Fe⁺² levels and to increased mitochondrial ROS production. This defect in iron metabolism sensitizes SDHB, but not SDHD-mutant cells to pro-oxidant molecules, raising potential interesting clinical perspectives to design new therapeutic strategies to target specifically SDHB-mutated tumours [23].

A selected talk was presented by Assia Thiamou from Liège University in Belgium. She identified a link between methylglyoxal (MG), a highly reactive by-product of glycolysis, and DNA methylation. She illustrated another interesting example linking the metabolic reprogramming of cancer cells to their epigenome. In triple negative breast cancer (TNBC) cells, shRNA-mediated knock-down of GLO1 or GLO2, two enzymes involved in the detoxification of MG, or MG treatment, increased CpG methylation through the upregulation of the DNMT3A and DNMT3B DNA methyltransferases. Consistent with the importance of the DNA hypermethylation phenotype in the transcription of cancer-related genes in these TNBC cells, treatment with the demethylating agent 5AZA reverted the effects of MG accumulation on the transcription of tumour suppressor genes and on their migratory capacity. Altogether, these unpublished data link glycolysis to MG stress and DNA hypermethylation, highlighting an additional mechanism by which the deregulation of this key metabolic pathway contributes to the aggressiveness of cancer cells.

Histone post-translational modifications are also important integrators of signals originating from metabolic changes. Enzymes which use the metabolites S-adenosyl-methionine and AcetylCoenzymeA (AcCoA) as essential cofactors (methyl- and acetyl- transferases, respectively), mediate methylation and acetylation, the two most studied modifications of histone tails. Robert Schneider's lab (Institute of Functional Epigenetics, Munich, Germany) made important findings to show that these two modifications of histones are likely to represent just the tip of the iceberg and that many lysine residues of histone tails are also targets for other types of acylations including butyrylation and propionylation, which contribute to transcriptional activation. These modifications are intrinsically linked to the metabolic status of these cells since their addition requires propionyl-CoEnzymeA and butyryl-Coenzyme A as cofactors, two products of lipid and amino acid catabolism. We are just beginning to grasp the functions of these different acylations, but they raise important questions regarding the mechanisms by which the availability of specific nutrients can influence gene expression.

These examples illustrate the ever-growing notion that metabolic changes can alter gene expression through modifications of DNA or histones, however, much less is known about potential connections between metabolites and RNA modifications. An original finding by the Schneider lab was presented at this meeting, linking two methyltransferases, Methyltransferase Like 5 and 6 (METTL5 and METTL6) to RNA methylation. Strikingly, METTL5 failed to show any DNA methyltransferase activity *in vitro* but efficiently methylates total RNA. Mass-spectrometry analyses showed that METTL5 catalyses the generation of N6-methyladenosine (m⁶A) of the 18S ribosomal RNA at position 1832, a modification influencing protein translation in embryonic stem cells and thereby their pluripotency. *Mettl5* knock-out (KO) mice display phenotypes that are reminiscent of some of the clinical symptoms observed in patients harbouring *Mettl5* mutations, including intellectual and locomotor deficiencies. The Schneider laboratory also studies METTL6, another RNA methyltransferase that was initially identified in a genetic screen aiming at identifying methyltransferases influencing tumour growth. METTL6 catalyses 3-Methylcytidine (m3C) modification of a subset of serine tRNAs at position C32, thereby influencing codon specific translation. Interestingly, *Mettl6* KO mice display metabolic phenotypes and liver defects, highlighting a previously unknown role for this RNA modification in glucose metabolism.

Another interesting illustration of the close links between RNA biology and metabolism came from a selected talk presented by Yvan Martineau (CRCT, University of Toulouse). He used a translational approach to classify pancreatic cancers and identified an interesting subgroup of PDACs characterised by the induction of the Integrated Stress Response (ISR) and a higher translation rate of *ATF4*, a key mediator of this cellular pathway, which is activated in response to several stress types including decreased amino-acid availability. This group showed that the induction of the ISR response in these cancer cells reflects their inability to express genes implicated in *de novo* serine synthesis and the transsulphuration pathway despite high levels of ATF4, thereby leading to high dependency on exogenous serine and cysteine [24].

These few examples are very illustrative of the complexity of the connections between metabolism and the epigenome and the epitranscriptome. Looking deeper into those links is likely to provide new anticancer strategies.

Technological breakthroughs are of the utmost importance in order to shed light on the mechanisms driving the metabolic reprogramming of cancer cells.

Single cell approaches to study metabolism are still in their infancy and therefore the work performed by Rafael Jose Argüello's team (CIML, Marseille, France) is of major interest. This team developed SCENITH, a flow cytometry-based assay aiming at analysing energetic metabolism at the single cell level [25]. SCENITH allows for the study of metabolic responses in multiple cell types in parallel by flow cytometry and is suitable to perform metabolic studies *ex vivo*, particularly in rare cells in whole blood/tissue samples, avoiding metabolic biases introduced by culture media. SCENITH is an original and powerful method to reveal metabolic heterogeneity in complex systems and to link metabolic features to other molecular information (such as epigenetic marks), even in rare cell subpopulations. Such an approach is needed to further characterise the complexity of metabolic changes in cancer, which is likely to improve patient stratification.

SESSION IV: Signalling, fuelling and metabolism in cancer

In the context of cancer cells, the duality of the immune system is of utmost significance, as it contributes to both the development and diminution of malignant cells. Over the course of the last decade, advances in immunotherapy have provided a marked improvement in cancer treatment. In this regard, Maya Saleh and her team (Immunconcept, University of Bordeaux) focus on the impact of metabolic alteration of the immune system during auto-immune disease and cancer. To this end, they performed a single-cell approach to characterise liver immune cells during the development of hepatocellular carcinoma (HCC) [26]. Specifically, they identified two genes, O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA) involved into the polarisation of tumour-associated macrophage (TAM; Fig. 1). These genes encode two rate-limiting enzymes implicated in hexosamine biosynthetic pathway (HBP). This branch of glycolysis produces UDP-GlcNAc, a substrate for protein glycosylation that acts as a novel determinant of macrophage response. The absence of OGT and OGA significantly decreased tumour growth in glioma *in vivo*. Dr. Saleh highlighted a novel aspect of the HBP pathway as a promising therapeutic target for the reduction of inflammation and the reactivation of antitumour immunity.

Lipotoxicity is the consequence of excessive accumulation of lipids in cells and organelles which causes endoplasmic reticulum and oxidative stress, thus leading to cell death. Dr. Alicia Kowaltowski's work (Institute of Chemistry, Brazil) aims at discovering the early bioenergetic results of lipid overload in hepatic

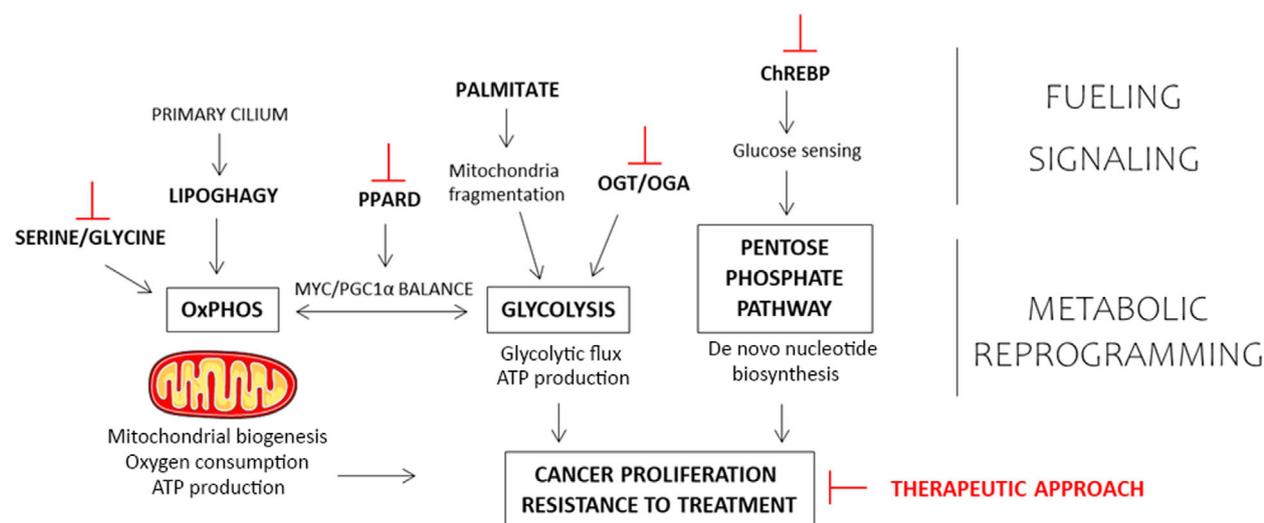


Fig. 1. Highlights of session 4: Fuel signalling and metabolism. Intermediates: metabolites (serine/glycine, palmitate), cellular processes (Lipophagy), transcription factors (PPARD, ChREBP), enzymes OGT and OGA driving fuel signalling act on cellular metabolism: OXPHOS, Glycolysis, Pentose Phosphate pathway to regulate proliferation and resistance to treatments.

cells [27]. The treatment of cells with palmitate (the most abundant saturated fatty acid in human serum) caused fragmentation in mitochondrial morphology. Moreover, the accumulation of palmitate caused a glycolytic shift (Pasteur effect), resulting in the increase in glycolytic flux and ATP production. This also promoted the production of ROS at different sites of the ETC, leading to a redox imbalance. Selective ETCIII inhibitors (SIQEL and S3QEL) demonstrated that increasing ROS (H_2O_2) contributes to the metabolic rewiring induced by palmitate (not oleate) accumulation. Such observations require further analysis especially regarding the notion that lipotoxicity contributes to the regulation of glycolysis and redox imbalance in hepatic cells.

Metabolic reprogramming is a major determinant of cancer development and is defined as a hallmark of cancer by Hanahan and Weinberg. [28]. During recent years, the identification of key metabolite candidates for survival has become a potential therapeutic approach in cancer. In the liver, transcription factor carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) is the main mediator in glucose sensing and utilisation. It plays a central role in the modulation of glucose action among glycolytic, pentose phosphate and lipogenic gene expression. Interestingly, ChREBP is over expressed in hepatocarcinoma (HCC) and is also associated with poor prognosis, thus posing as a good candidate for study in the context of HCC. Emmanuel Benichou (Institute Cochin, Paris) showed that overexpression of ChREBP in murine liver using a transposon system promotes initiation and development of HCC and recapitulates the

course of the human disease in mice. This overexpression is associated with a rewiring of glutamine and glucose metabolism, which leads to enhance *de novo* nucleotide biosynthesis and sustainable growth. These results suggest that the pharmacological inhibition of ChREBP represents a promising therapeutic approach in the treatment of HCC (Fig. 1).

In response to stress conditions such as chemical toxicity, nutritional and oxidative stress, or mechanical (shear) stress, intrinsic pathways of autophagy can be activated in kidney epithelial cells (KEC). Such adaptive and dynamic mechanisms are characterised by selective degradation of cellular components and by the recycling of macromolecules. Etienne Morel (Institute Necker, Paris) demonstrated the implication of shear stress during the specific dialogue between primary cilium and the autophagic machinery of KECs [29]. The fluid flow sensing capabilities of primary cilium favours mitochondrial biogenesis through the increased expression of mitochondrial master regulators such as Mitochondrial transcription factor A (TFAM) and PGC1 α . This leads to a profound metabolic reprogramming, which includes an increase in oxygen consumption and total ATP production, essential to fully differentiate KECs. More specifically, fluid flow promotes lipophagy, a specialized autophagic program that degrades lipid droplets, thus contributing to the production of free fatty acids providing mitochondrial substrates to fuel mitochondria and generate ATP through β -oxidation. This specific metabolic interaction between shear stress and autophagy

potentially explains how primary cilia use lipophagy to fuel mitochondria and enable the proper translation of mechanical forces.

PDAC, the most common form of pancreatic cancer, is an extremely lethal disease due to late diagnosis, aggressiveness, and lack of effective therapies. In this context, Beatriz Parejo-Alonso (IIS Aragon, Zaragoza) discussed the role of Peroxisome Proliferator-activated Receptor Delta (PPARD) in the MYC/PGC-1 α -dependent metabolic phenotype of PDAC cells. This molecular cascade controls stemness and invasiveness of PDAC, as well as the implication of TAM microenvironmental signals in this pathway [30]. This group demonstrated that PPARD is upregulated after treatment with EMT inducers or TAM-conditioned medium. Interestingly, pharmacological activation of PPARD induces invasion associated with an increase in EMT-related gene expression. The metabolic switch induced by PPARD and MYC/PGC-1 α is characterised by a decrease in oxygen consumption and an increase in glycolysis. Conversely, PPARD inhibition increases the invasive capacity of highly metastatic cells and enhances mitochondrial metabolism (the increase of oxygen consumption and ATP-linked respiration) associated with a decrease in glycolysis metabolism (the decrease of extracellular acidification). This research highlights the pro-metastatic role of PPARD in PDAC and proposes a potential therapeutic approach for treating cancers with high PPARD.

A multitude of studies clearly reveal that obesity can lead to increased cancer risk. Studies aiming at investigating the impact of diets on cancer progression became a field of active research in recent years. In this context, Dr. Karen Vousden (The Francis Crick Institute, London) discussed some of their pioneer work in which they addressed how specific diets influence cancer development and therapeutic responses. Her work initially focussed on TP53, the most frequently mutated tumour suppressor in human cancer. Over the past years, Dr. Vousden and colleagues demonstrated that p53 plays a protective role when cells face a nutrient challenge. During this meeting, she presented an elegant *in vivo* reporter system of p53 transcriptional activity that they used to show that p53 promotes normal liver function by limiting stress in hepatocytes when animals are fed with a high fat diet. An important aspect of p53-associated metabolic functions relates to its ability to sustain serine/glycine metabolism. These two non-essential amino acids, which can be either taken up from the environment or newly synthesised through the serine synthesis pathway, play important roles in many anabolic reactions including redox homeostasis as well as protein, nucleotide and lipid biosynthesis. Several groups, including Dr. Vousden's

team previously showed that a functional p53 pathway is essential for cells to stimulate de novo serine synthesis in conditions when exogenous serine and glycine become limiting. In this meeting, she showed some of their recent data indicating that pharmacological inhibition of phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH), a rate-limiting enzyme in this anabolic pathway, impinges on cancer growth when combined with a serine and glycine-deprived diet [31]. The effect involves a strong cooperative effect on the one carbon cycle, a key metabolic pathway involved in purine synthesis. This evidence supports the notion that dietary modulation is a promising strategy to enhance the efficiency of anticancer therapeutics.

General public session of nutrition and cancer

Following the 2-day scientific meeting, an online event for patients and the general public, focussing on cancer and nutrition, was organised. Since 2017, the SIRIC BRIO (Bordeaux integrated cancer research site) has developed an expertise in mixing scientific discussions and comedian performances for general public events. On this occasion, it teamed with the national network on nutrition and cancer (NACRe) and the association 'soins de support' to organise an online event in French.

The concept included a comedian couple (acting as a patient and his wife) who reacted and played a scene after each scientific presentation, as if they were watching a television broadcast from their house. The content of their performance had been prepared through interviews of the scientists and was closely inspired by their messages, while the added off-the-wall humour had been previously tested with BRIO's patient and carer collective. This allowed different perspectives on the issues, prevented the tone from being too serious, included a change of rhythm and overall reinforced the messages either by repetition or by opposition.

The three-hour meeting started by a short explanation of what is cancer metabolism research and what the scientific meeting had been about. It then covered, in a very accessible manner, the impact of nutrition during and after treatment, restrictive diets, undernourishment and the special issue of older patients. One presentation also commented on the commonly heard messages on nutrition and cancer. The overall idea was to insist on what is proven and what is not, what could potentially be harmful and where to get reliable information. Interestingly, after each presentation the actors highlighted the important role of the family members accompanying the patients.

Finally, the eight scientists answered many questions from the public in a dedicated session.

This successful experience should encourage us to offer more opportunities of interactions between scientists and the public. When academic meetings are organised, a public event (in the national language) should be considered. This is particularly important on health issues for which the information discussed helps empower people in their personal life. Despite the lack of direct interaction, webinars are useful to reach a wide audience, and audacious formats, where trusted scientific content is presented with a twist, can still be imagined. Out of the context of a pandemic, the event would ideally be co-created with patients and carers, as done previously for BRIO's public events.

Conclusion

Many aspects of cancer metabolism were covered during this meeting. The speakers highlighted some of the newest findings showing how metabolism plays an essential role in the initiation and progression of carcinogenesis, and how it modulates the response to different therapies. Cancer cells are dependent on many metabolic pathways and this dependence represents interesting targets. A better understanding of the complex signalling pathways that modulate metabolism will help designing new therapies that may synergize with standard treatments. Moreover, diet modulation can alter cancer growth by limiting the metabolic plasticity of cancer cells. Collectively, these presentations confirm the utility of novel therapeutics targeting cellular metabolism to improve patient outcome.

Acknowledgements

We thank La Ligue Nationale contre le cancer, the ARC foundation and the Société Française du Cancer for their support. The meeting was sponsored by The Canceropole Sud-Ouest, The Region Nouvelle-Aquitaine and the Université of Bordeaux. The public session on nutrition and cancer was organised in collaboration with the French network on nutrition and cancer (NACRe), the French association 'soins de support' and the SIRIC BRIO (Bordeaux Recherche Intégrée en Oncologie), the Bordeaux integrated cancer research site. We would like to address special thanks to Karine Marendziak, Bernard Srour and the team of Comnco.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

NAH, EB, AL, LL, AR, GRC and NC wrote the manuscript, AC, LLC, NMM, JER, SR, JES, SV, MVL, RR and FB read and corrected the manuscript.

Data availability statement

The data that support the findings were reported by the speakers during the meeting.

References

- 1 Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord ENJ, Smith AC *et al.* (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* **515**, 431–435.
- 2 Chouchani ET, Pell VR, James AM, Work LM, Saeb-Parsy K, Frezza C, Krieg T & Murphy MP (2016) A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury. *Cell Metab* **23**, 254–263.
- 3 Mills EL, Kelly B, Logan A, Costa ASH, Varma M, Bryant CE, Tournalmousis P, Däbritz JHM, Gottlieb E, Latorre I *et al.* (2016) Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages. *Cell* **167**, 457–470.e13.
- 4 Yin Z, Burger N, Kula-Alwar D, Aksentijević D, Bridges HR, Prag HA, Grba DN, Viscomi C, James AM, Mottahedin A *et al.* (2021) Structural basis for a complex I mutation that blocks pathological ROS production. *Nat Commun* **12**, 707.
- 5 Daher B, Parks SK, Durivault J, Cormerais Y, Baidarjad H, Tambutte E, Pouyssegur J & Vučetić M (2019) Genetic ablation of the cystine transporter xCT in PDAC cells inhibits mTORC1, growth, survival, and tumor formation via nutrient and oxidative stresses. *Can Res* **79**, 3877–3890.
- 6 Meira W, Daher B, Parks SK, Cormerais Y, Durivault J, Tambutte E, Pouyssegur J & Vučetić M (2021) A cystine-cysteine intercellular shuttle prevents ferroptosis in xCT(KO) pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancers* **13**.
- 7 Porporato PE, Payen VL, Pérez-Escuredo J, De Saedeleer CJ, Danhier P, Copetti T, Dhup S, Tardy M, Vazeille T, Bouzin C *et al.* (2014) A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell Rep* **8**, 754–766.
- 8 Masoud R, Reyes-Castellanos G, Lac S, Garcia J, Dou S, Shintu L, Abdel Hadi N, Gicquel T, El Kaoutari A, Diémé B *et al.* (2020) Targeting mitochondrial complex I overcomes chemoresistance in high OXPHOS pancreatic cancer. *Cell Rep Med* **1**, 100143.
- 9 Ratcliffe PJ, O'Rourke JF, Maxwell PH & Pugh CW (1998) Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and

- the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol* **201**, 1153–1162.
- 10 Chowdhury R, Leung IK, Tian YM, Abboud MI, Ge W, Domene C, Cantrelle FX, Landrieu I, Hardy AP, Pugh CW *et al.* (2016) Structural basis for oxygen degradation domain selectivity of the HIF prolyl hydroxylases. *Nat Commun* **7**, 12673.
 - 11 Kaelin WG Jr & Ratcliffe PJ (2008) Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* **30**, 393–402.
 - 12 Loreti E, van Veen H & Perata P (2016) Plant responses to flooding stress. *Curr Opin Plant Biol* **33**, 64–71.
 - 13 Masson N, Keeley TP, Giuntoli B, White MD, Puerta ML, Perata P, Hopkinson RJ, Flashman E, Licausi F & Ratcliffe PJ (2019) Conserved N-terminal cysteine dioxygenases transduce responses to hypoxia in animals and plants. *Science* **365**, 65–69.
 - 14 Wykoff CC, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL & Ratcliffe PJ (2000) Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling. *Oncogene* **19**, 6297–6305.
 - 15 Pugh CW & Ratcliffe PJ (2017) New horizons in hypoxia signaling pathways. *Exp Cell Res* **356**, 116–121.
 - 16 Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C *et al.* (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917–921.
 - 17 Chan N, Pires IM, Bencokova Z, Coackley C, Luoto KR, Bhogal N, Lakshman M, Gottipati P, Oliver FJ, Helleday T *et al.* (2010) Contextual synthetic lethality of cancer cell kill based on the tumor microenvironment. *Can Res* **70**, 8045–8054.
 - 18 Chiappa M, Guffanti F, Bertoni F, Colombo I & Damia G (2021) Overcoming PARPi resistance: preclinical and clinical evidence in ovarian cancer. *Drug Resist Updat* **55**, 100744.
 - 19 Mehibel M, Xu Y, Li CG, Moon EJ, Thakkar KN, Diep AN, Kim RK, Bloomstein JD, Xiao Y, Bacal J *et al.* (2021) Eliminating hypoxic tumor cells improves response to PARP inhibitors in homologous recombination-deficient cancer models. *J Clin Investig* **131**, e146256.
 - 20 Tusa I, Cheloni G, Poteti M, Silvano A, Tubita A, Lombardi Z, Gozzini A, Caporale R, Scappini B, Dello Sbarba P *et al.* (2020) In vitro comparison of the effects of imatinib and ponatinib on chronic myeloid leukemia progenitor/stem cell features. *Target Oncol* **15**, 659–671.
 - 21 Giuntoli S, Tanturli M, Di Gesualdo F, Barbetti V, Rovida E & Dello Sbarba P (2011) Glucose availability in hypoxia regulates the selection of chronic myeloid leukemia progenitor subsets with different resistance to imatinib-mesylate. *Haematologica* **96**, 204–212.
 - 22 Bono S, Lulli M, D'Agostino VG, Di Gesualdo F, Loffredo R, Cipolleschi MG, Provenzani A, Rovida E & Dello Sbarba P (2016) Different BCR/Abl protein suppression patterns as a converging trait of chronic myeloid leukemia cell adaptation to energy restriction. *Oncotarget* **7**, 84810–84825.
 - 23 Morin A, Goncalves J, Moog S, Castro-Vega LJ, Job S, Buffet A, Fontenille MJ, Woszczyk J, Gimenez-Roqueplo AP, Letouzé E *et al.* (2020) TET-mediated hypermethylation primes SDH-deficient cells for HIF2 α -driven mesenchymal transition. *Cell Rep* **30**, 4551–4566.e7.
 - 24 Shin S, Nicolle R, Jean C, Samain R, Ayadi M, Raffenne J, Brunel A, Solorzano J, Neuzillet C, Joffre C *et al.* (2021) Translatome-based classification reveals a dual metabolic dependency of a new tumor subtype of pancreatic cancer. *Pancreatology* **21**, S43.
 - 25 Argüello RJ, Combes AJ, Char R, Gigan JP, Baaziz AI, Bousiquot E, Camosseto V, Samad B, Tsui J, Yan P *et al.* (2020) SCENITH: a flow cytometry-based method to functionally profile energy metabolism with single-cell resolution. *Cell Metab* **32**, 1063–1075.e7.
 - 26 Giraud J, Chalopin D, Blanc JF & Saleh M (2021) Hepatocellular carcinoma immune landscape and the potential of immunotherapies. *Front Immunol* **12**, 655697.
 - 27 Kakimoto PA, Chausse B, Caldeira da Silva CC, Donato Júnior J & Kowaltowski AJ (2019) Resilient hepatic mitochondrial function and lack of iNOS dependence in diet-induced insulin resistance. *PLoS One* **14**, e0211733.
 - 28 Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674.
 - 29 Miceli C, Roccio F, Penalva-Mousset L, Burtin M, Leroy C, Nemazany I, Kuperwasser N, Pontoglio M, Friedlander G, Morel E *et al.* (2020) The primary cilium and lipophagy translate mechanical forces to direct metabolic adaptation of kidney epithelial cells. *Nat Cell Biol* **22**, 1091–1102.
 - 30 Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, Bou Kheir T, Jagust P, Schoenhals M, Barneda D, Sellers K, Campos-Olivas R, Graña O *et al.* (2015) MYC/PGC-1 α balance determines the metabolic phenotype and plasticity of pancreatic cancer stem cells. *Cell Metab* **22**, 590–605.
 - 31 Tajan M, Hennequart M, Cheung EC, Zani F, Hock AK, Legrave N, Maddocks ODK, Ridgway RA, Athineos D, Suárez-Bonnet A *et al.* (2021) Serine synthesis pathway inhibition cooperates with dietary serine and glycine limitation for cancer therapy. *Nat Commun* **12**, 366.

