

Révéler le phénotype et les fonctions métaboliques cellulaires avec les tests de stress oxydant du substrat XF d'Agilent

Auteurs

George W. Rogers
Agilent Technologies,
La Jolla, CA

Lisa P. Winer
Agilent Technologies,
Lexington, MA

Ryan McGarrigle
Agilent Technologies,
Cork, Irlande

Alice Gao
Agilent Technologies,
Lexington, MA

James Hynes
Agilent Technologies,
Cork, Irlande

Résumé

La technologie Agilent Seahorse XF permet de mesurer le métabolisme énergétique des cellules vivantes en temps réel, fournissant ainsi des informations essentielles sur leurs fonctions en lien direct avec leur état de santé et de forme physique. Le test du stress oxydant du substrat Agilent Seahorse XF fournit des mesures clés facilitant l'exploration de substrats de mitochondries spécifiques, pertinents ou nécessaires au phénotype et aux fonctions cellulaires. Cette étude donne une vue d'ensemble de la stratégie de ce test, des exemples de données obtenues et des manières optimales d'appliquer ces méthodes dans le domaine du cancer et du métabolisme des cellules immunitaires. Elle signale également la pertinence du test pour la découverte de médicaments.

Introduction

Le métabolisme est aujourd'hui reconnu comme étant un facteur clé pour de nombreuses fonctions importantes des cellules normales ou pathologiques.^{1,2} Le fait d'établir les besoins en substrats dans des expériences contrôlées peut fournir des informations utiles à différents domaines de la recherche, telles que l'identification de drogue ciblée et sa validation en oncologie, les dysfonctionnements immunitaires, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et les modèles de maladies des cellules souches.^{3,4,5}

La technologie Agilent Seahorse XF est une plateforme intégrée sans étiquette qui combine parfaitement l'analyseur XF, la cartouche du capteur, les kits de test et le logiciel pour obtenir des données du métabolisme fonctionnel cellulaire avec une cinétique en temps réel. Sur cette plateforme, Agilent offre divers kits de test XF capables de fournir tout un spectre d'informations, allant d'une évaluation globale de la fonction cellulaire à des détails particuliers de mécanisme métabolique, brièvement énumérés dans la Figure S1.

Les tests de stress oxydants du substrat XF constituent une suite de tests optimisés développée pour mesurer l'oxydation de substrats cellulaires. Ces tests portent sur trois substrats principaux responsables des activités des mitochondries : les acides gras à longue chaîne (AGLC), le glucose/pyruvate et/ou la glutamine (Figure 1). En effectuant des évaluations exhaustives des mitochondries avec le test XF Cell Mito Stress et des inhibiteurs de voies métaboliques d'oxydation de certains substrats, les cellules sont testées dans des conditions de faible demande de substrat (c.à-d. de respiration basale), mais aussi dans des conditions de demande plus élevée de ces substrats (c.à-d. de respiration maximale) où une dépendance/un assujettissement à caractère essentiel est plus souvent révélé(e) (Figure 2). Ces kits facilitent l'exploration pratique des processus d'oxydation de substrats spécifiques, et le rôle qu'ils jouent dans les fonctions fondamentales des cellules que sont l'activation, la prolifération et la différenciation. En outre, ils peuvent être utilisés pour caractériser les réponses à des manipulations génétiques, des interventions pharmaceutiques ou des micro-environnements spécifiques d'oxydation de substrats particuliers pertinents sur le plan pathologique.

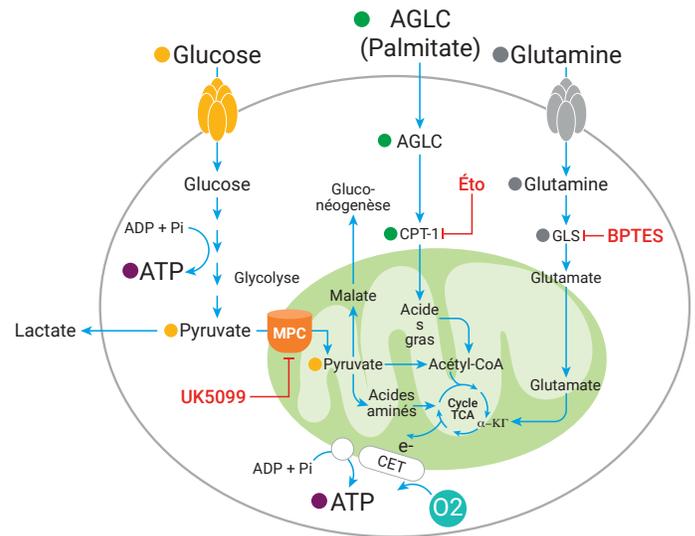


Figure 1. Voies métaboliques principales, y compris la glycolyse, le cycle de Krebs, la chaîne de transport des électrons (CET) et la phosphorylation oxydative (PhosOx). L'oxydation du glucose/pyruvate, de la glutamine et des acides gras à longue chaîne est mise en exergue. Les lignes/le texte en rouge indiquent les inhibiteurs pertinents du métabolisme du glucose/pyruvate, des AGLC et de la glutamine, qui à leur tour limitent spécifiquement l'oxydation de ces substrats respectifs.

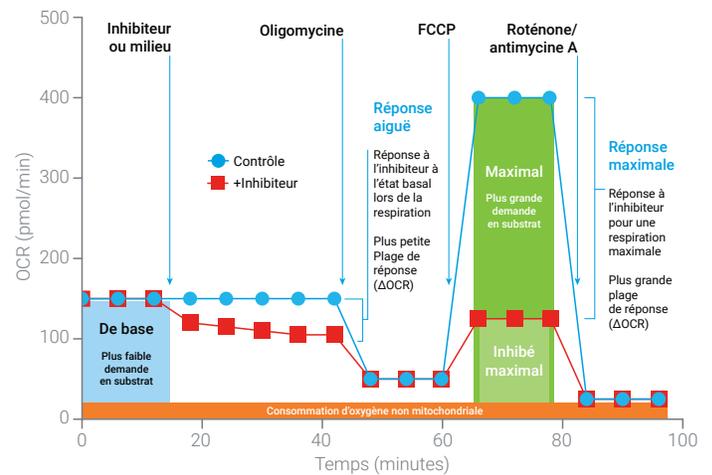


Figure 2. Profil des paramètres de respiration critiques pour la demande en substrat du test Agilent Seahorse XF de test du stress oxydant du substrat. Les injections séquentielles de composés mesurent la respiration basale, la réponse aiguë à l'inhibiteur (étomoxir, UK5099 ou BPTES), et la respiration maximale en l'absence ou la présence d'inhibiteur. Il est à noter que bien que des changements minimes soient observés dans des conditions basales, c.-à-d. la réponse aiguë, des réponses beaucoup plus importantes sont souvent révélées dans des conditions de demande importante de substrat (par ex. FCCP), révélant ainsi des différences de capacité de cellules à oxyder le substrat en question.

Données expérimentales

Toutes les lignées cellulaires ont été maintenues conformément aux recommandations du fournisseur. Pour les tests XF, des cellules A549 ont été ensemencées dans des microplaques de culture cellulaire XF96 à une densité de $1,5 \times 10^4$ cellules par puits dans du milieu DMEM F12 (Corning 10-090-CV) additionné de Glutamax 2 mM et de sérum à 10 %. Des cellules C2C12 ont été ensemencées dans des microplaques de culture cellulaire XF96 à une densité de $1,2 \times 10^4$ cellules par puits dans du milieu DMEM haute teneur en glucose (Gibco 11960) additionné de glutamine 4 mM, pyruvate 1 mM et de sérum à 10 %. Des cellules HepG2 ont été ensemencées dans des microplaques de culture cellulaire XF96 à une densité de $2,0 \times 10^4$ cellules par puits dans du milieu DMEM faible teneur en glucose (Gibco 11885) additionné de Glutamax 2 mM et de sérum à 10 %. Toutes les cellules ont été incubées pendant une nuit à 37 °C, 5 % de CO₂. Le jour suivant, les cellules ont été lavées deux fois avec le milieu du test d'oxydation du substrat (XF DMEM pH 7,4 plus XF Glucose 10 mM, XF Pyruvate 1 mM et XF Glutamine 2 mM) puis incubées à 37 °C, sans CO₂, pendant 60 minutes. Les plaques de culture cellulaire ont ensuite été transférées vers des analyseurs XFe96 pour évaluer la performance du test, en utilisant de l'étomoxir (4 µM), UK5099 (2 µM) ou du BPTES (3 µM) dans le Port A, suivi d'une injection séquentielle d'oligomycine (1,5 µM), de FCCP (1,5 µM pour les trois types de cellules), et de roténone/antimycine A (0,5 µM chaque) (concentrations finales). Les cellules ont été dénombrées (pour la normalisation) à l'aide d'un instrument Cytation 5.

Tous les tests XF ont été effectués ainsi que décrit dans le guide d'utilisation du test d'oxydation du substrat XF, y compris les dilutions de composés et la préparation des cartouches de capteurs.

La méthode analytique Agilent Seahorse a été utilisée pour calculer les paramètres de respiration basale, réponse aiguë et respiration maximale du test de stress oxydant du substrat. Ces paramètres sont définis dans la méthode analytique Seahorse. L'OCR basal après l'addition d'inhibiteur et l'OCR maximal en présence d'inhibiteur (Figure 7) pour chaque type de cellule ont été calculés comme suit et représentés sous forme de graphiques sous Microsoft Excel :

- **OCR basal après l'addition d'inhibiteur** = $\frac{[(OCR \text{ basal} + OCR \text{ de réponse aiguë}) / OCR \text{ basal}]}{1} \times 100 \%$
- **OCR maximal en présence de l'inhibiteur** = $\frac{[(OCR \text{ de contrôle maximal} - OCR \text{ inhibé maximal}) / OCR \text{ de contrôle maximal}]}{1} \times 100 \%$

Matériaux

Matériau	Fournisseur
Lignée cellulaire A549	ATCC
Lignée cellulaire C2C12	ATCC
Lignée cellulaire HepG2	ATCC
Milieu DMEM/F12	Corning
Milieu DMEM haute teneur en glucose	Gibco
Milieu DMEM faible teneur en glucose	Gibco
Glutamax	Gibco
Sérum	Hyclone
Plaques de culture cellulaire XF96	Agilent
Cartouches de capteurs XFe96	Agilent
Solution étalon XF	Agilent
Milieu de test XF DMEM pH 7,4	Agilent
Glucose XF	Agilent
Pyruvate XF	Agilent
Glutamine XF	Agilent
Kit XF de test du stress oxydant des acides gras à longue chaîne	Agilent
Kit XF de test du stress oxydant du glucose/pyruvate	Agilent
Kit XF de test du stress oxydant de la glutamine	Agilent
Analyseur Seahorse XFe96	Agilent
Cytation 5	BioTek, qui fait partie d'Agilent

Test de stress oxydant du substrat XF : stratégie expérimentale et conception du test

Les tests de stress d'oxydation du substrat XF combinent le test XF Cell Mito Stress (MST) aux inhibiteurs suivants spécifiques à des voies métaboliques de substrats (Figure 1) :

- L'étomoxir (Éto) pour l'inhibition des AGLC via l'inhibition de la carnitine palmitoyl transférase 1a (CPT1a).⁶
- UK5099 pour l'inhibition du glucose ou du pyruvate via l'inhibition du transporteur mitochondrial du pyruvate (MPC).⁷
- BPTES pour l'inhibition de la glutamine via la glutaminase 1 (GLS-1).⁸ Il est à noter que le BPTES n'inhibe pas la glutaminase 2 (GLS2).

Le MST, un outil puissant et reconnu pour évaluer les fonctions mitochondriales avec ces inhibiteurs peut être utilisé pour révéler la dépendance d'un substrat métabolique en particulier. Le MST permet de rapporter les taux de respiration basale et maximale, qui sont des mesures clés des fonctions mitochondriales. Dans le contexte de l'oxydation des substrats, les taux de respiration basale et surtout maximale sont largement impactés par la capacité des cellules à transporter et oxyder les substrats disponibles.⁹ Cette méthode est idéalement adaptée à l'évaluation de la demande cellulaire en substrat dans des

conditions basales et en réponse à une augmentation de la demande en substrat (respiration maximale). La Figure 2 illustre le profil cinétique d'un test d'oxydation du substrat standard et les paramètres de test pertinents.

Pour effectuer un test de stress oxydant du substrat, la respiration basale est mesurée puis l'inhibiteur spécifique à la voie métabolique injecté. La réponse aiguë à l'inhibiteur est mesurée pendant plusieurs cycles (typiquement six), et suivie d'une injection séquentielle standard d'oligomycine, de FCCP et de roténone/antimycine A.

Les mesures fournissent des informations importantes, car la méthodologie décrite permet d'obtenir des données sur la respiration basale et l'impact de l'inhibition de la voie métabolique dans des conditions basales de demande de substrat, et permet également de caractériser l'impact des inhibitions des voies métaboliques sur la respiration maximale, reflétant la sensibilité des cellules à l'altération d'une voie métabolique particulière dans des conditions de demande en substrat plus importante.

Chaque kit vise à tester un seul substrat en utilisant la concentration (finale) optimale de l'inhibiteur pertinent :

- Étomoxir (4 μ M) pour inhiber l'oxydation des AGLC
- UK5099 (2 μ M) pour inhiber l'oxydation du glucose ou du pyruvate
- BPTES (3 μ M) pour inhiber l'oxydation de la glutamine (concentrations finales)

Les tests standard du stress oxydant du substrat sont conçus pour être réalisés dans des conditions de saturation des substrats en ce qui concerne le glucose (10 mM), le pyruvate (1 mM) et la glutamine (2 mM) dans le milieu du test. La source

d'acide gras à longue chaîne est toute réserve endogène de lipides/d'AGLC présents dans la cellule et dépend par conséquent de la cellule. La Figure 3 illustre les méthodes standard et les conditions de test de chacun des tests de stress oxydant du substrat XF. Il est à noter qu'à l'exception de l'identité de l'inhibiteur utilisé, les méthodes sont identiques.

Les réponses à un inhibiteur (Figure 2) suggèrent que la cellule a une demande ou une dépendance pour ce substrat en particulier dans les conditions expérimentales établies et ceci sera développé dans la discussion plus bas, mais en général, ce test standard d'oxydation du substrat est conçu pour être utilisé quand on souhaite poser les questions suivantes :

- La cellule présente-t-elle une demande pour un ou plusieurs substrats en particulier ?
- La cellule dépend-elle fortement d'un substrat en particulier ou d'autres substrats sont-ils susceptibles de satisfaire ses demandes ?
- Comment la demande ou la dépendance de substrats des mitochondries sont-elles affectées en cas d'intervention sur la cellule, telle qu'une manipulation génétique ou une exposition à un médicament ?

Comme la plupart des tests XF, les tests de stress oxydant du substrat sont typiquement réalisés après un prétraitement ou une intervention, selon la conception du chercheur. Il s'agit soit d'une intervention chronique sur les cellules (par ex. une manipulation génétique ou une exposition à long terme à un médicament), plusieurs heures ou jours avant le test XF, soit d'une intervention aiguë (une exposition à un médicament) juste avant le test XF (Figure 3). Dans certains cas, des interventions chroniques et aiguës peuvent être utilisées

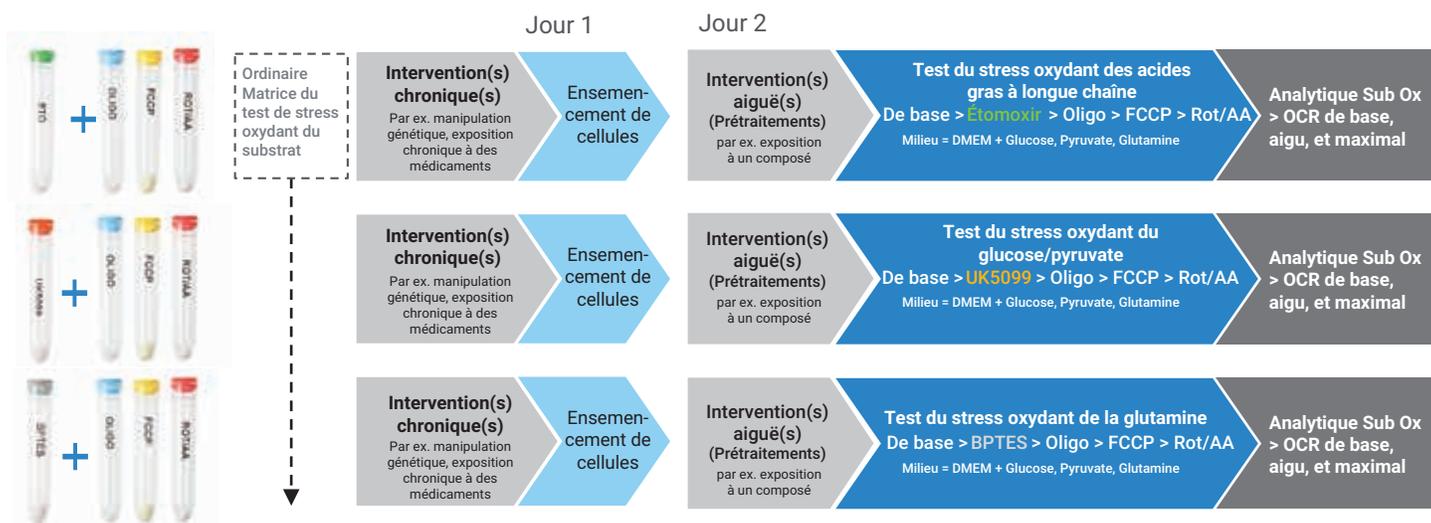


Figure 3. Utilisation des tests de stress oxydant du substrat Agilent Seahorse XF pour explorer la demande et la dépendance de substrats des mitochondries. Chaque kit vise à tester un seul substrat avec un inhibiteur pertinent : étomoxir pour inhiber l'oxydation des AGLC, UK5099 pour inhiber l'oxydation du glucose ou du pyruvate et BPTES pour inhiber l'oxydation de la glutamine. Des interventions chroniques ou aiguës (manipulations génétiques/expositions à des médicaments) peuvent être réalisées avant le test pour comprendre les effets de ces modulations sur l'oxydation de substrats spécifiques des mitochondries. Voir le texte pour plus d'informations.

(par ex. sauvetage d'un dysfonctionnement génétique par exposition à un composé). Les kits peuvent être utilisés individuellement (c.-à-d. en se focalisant sur un substrat en particulier) pour explorer comment une série d'interventions ou de composés peuvent affecter l'oxydation de ce substrat, ou en tant que suite complémentaire (concernant au moins deux substrats) pour explorer l'effet global d'une intervention donnée sur l'oxydation des substrats et les fonctions mitochondriales. Le guide d'utilisation des tests de stress oxydant du substrat XF propose plusieurs conceptions de matrices de test basées sur divers scénarios expérimentaux, et la Figure 4 illustre une matrice de test de conception simple utilisée pour générer les données présentées.

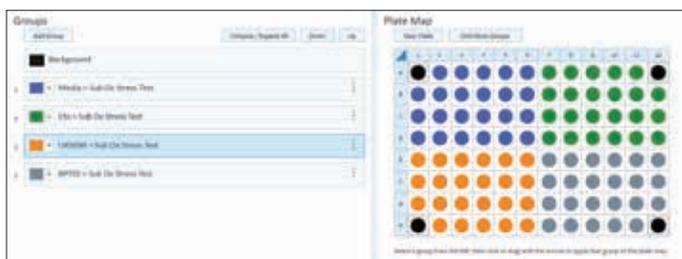


Figure 4. Matrice du test Agilent Xfe96 pour le test de stress d'oxydation du substrat utilisant plusieurs kits/inhibiteurs. Désignation des groupes et disposition sur la plaque pour tester un type de cellules avec trois inhibiteurs différents, y compris un groupe témoin (milieu du test injecté par le Port A). Cette matrice a été dupliquée trois fois en changeant uniquement le type de cellules utilisé (A549, C2C12 ou HepG2). Les autres informations sur la matrice du test et les commandes de l'instrument XF étaient les mêmes pour les autres tests.

Il est à noter qu'un autre protocole plus complexe et son kit dédié pour l'exploration spécifique de l'oxydation des acides gras à longue chaîne (AGLC) sont également disponibles. Le kit fournit des composantes supplémentaires telles que le substrat palmitate-BSA XF ; le protocole du test est décrit en détail dans le guide d'utilisation des tests de stress oxydant du substrat XF.

Résultats et discussion

Application des tests de stress oxydant du substrat

À l'aide de trois kits de test du stress oxydant de trois substrats différents (glucose/pyruvate, acide gras à longue chaîne et glutamine), trois lignées de cellules ont été examinées par le test standard et les matrices précédemment décrits (Figures 2 et 4). Les détails complets d'ensemencement des cellules, de culture cellulaire et de préparation du test XF sont décrits dans la section Méthodologie de ce document et dans le Guide d'utilisation des tests de stress oxydant du substrat.

La Figure 5 (panels A, B et C) montre les tracés cinétiques de l'OCR pour les cellules A549, C2C12 et HepG2, respectivement. La Figure 6 montre les paramètres de respiration basale, de réponse aiguë et de respiration maximale du test de stress oxydant du substrat chez des cellules HepG2.

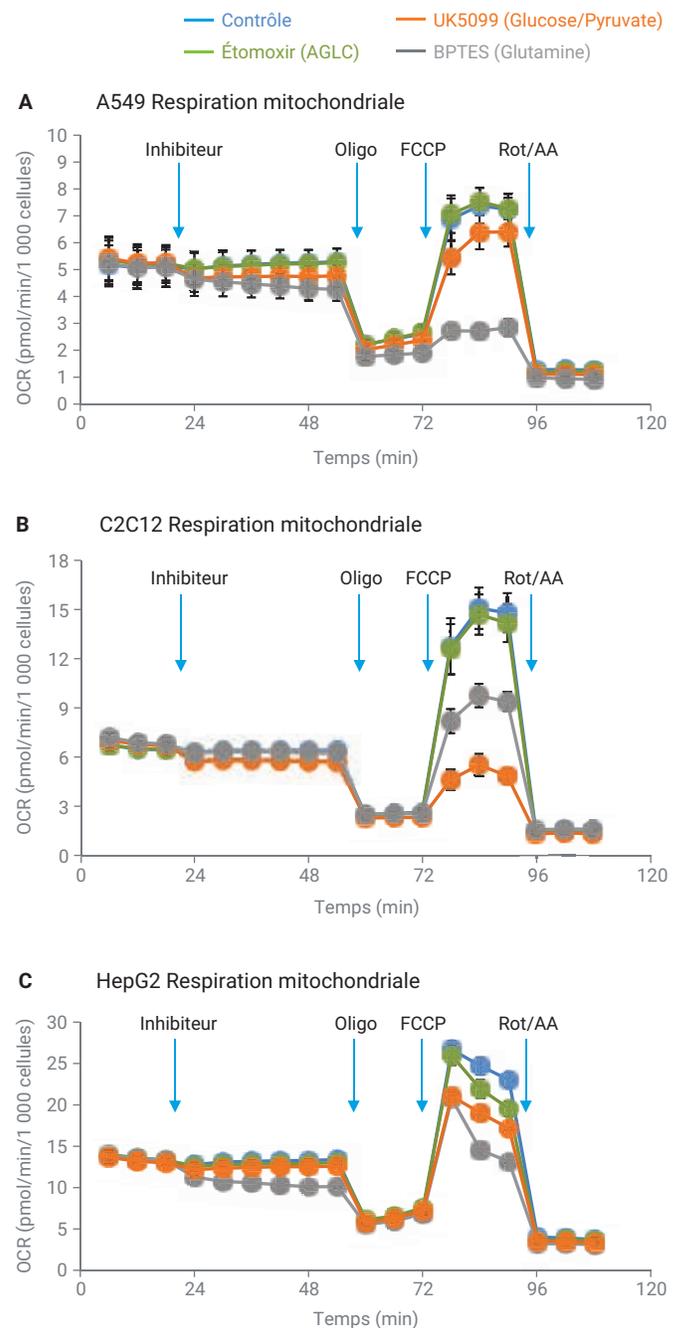


Figure 5. Comparaison de l'oxydation du substrat entre les cellules A549, C2C12 et HepG2 avec les kits de test XF de stress oxydant du glucose/pyruvate, des acides gras à longue chaîne et de la glutamine. Les cellules A549 (A), C2C12 (B) et HepG2 (C) ont été ensemencées sur des plaques de culture cellulaire Agilent XF96 et incubées une nuit. Les cellules ont été soumises à des tests XF de stress oxydant du substrat en utilisant des injections de milieu du test (témoin), d'étomoxir (oxydation des acides gras à longue chaîne), de UK5099 (oxydation du glucose/pyruvate) ou de BPTES (oxydation de la glutamine), suivies d'injections séquentielles communes d'oligomycine, de FCCP et de roténone/antimycine A. Milieu du test XF = DMEM XF, pH 7,4 + glucose 10 mM, pyruvate 1 mM et glutamine 2 mM. Chaque type de cellules a été testé au cours de trois jours différents (c.-à-d. N = 3) et les données obtenues ont été collectées et traitées par la méthode analytique Agilent Seahorse. Les écarts sont rapportés sous forme de \pm SEM.

L'inspection du paramètre de respiration basale de chaque type de cellules montre les résultats attendus, les conditions montrant des OCR de base identiques avant l'ajout de l'inhibiteur. Après injection de l'inhibiteur, chaque type de cellules présente une réponse aiguë détectable, bien que relativement restreinte par rapport à la respiration observée dans des conditions basales. Cependant, dans des conditions de respiration maximale (c.-à-d. des conditions de demande de substrat plus importante par les mitochondries), la réponse aux inhibiteurs augmente de manière significative et on observe différentes réponses aux différents inhibiteurs pour les trois lignées de cellules testées.

Par exemple, chez les cellules A549 (Figure 5A), on observe une réponse importante au BPTES alors qu'une réponse beaucoup plus faible est observée avec UK5099 et qu'aucune réponse n'est observée avec l'étomoxir. Ceci suggère que les cellules A549 dépendent de manière significative de l'oxydation de la glutamine dans des conditions d'importante demande en substrat. En revanche, les cellules C2C12 présentent une réponse significative à UK5099 et au BPTES (Figure 5B), ce qui indique que ces deux substrats sont nécessaires dans des conditions de demande maximale en substrat. À l'inverse, les cellules HepG2 présentent une dépendance plus équilibrée au glucose/pyruvate, aux AGLC et à la glutamine dans des conditions de respiration maximale (Figure 5C) puisque l'on observe des réponses significatives à UK5099, à l'étomoxir ainsi qu'au BPTES. La Figure 7 résume les résultats de l'OCR basal après l'ajout des inhibiteurs et de l'OCR maximal en présence d'inhibiteur pour les différents types de cellules. Il est à noter que les modifications de respiration maximale constituent le paramètre qui donne le plus d'informations pour évaluer la dépendance du substrat des mitochondries du fait des conditions de demande plus importante en substrat.

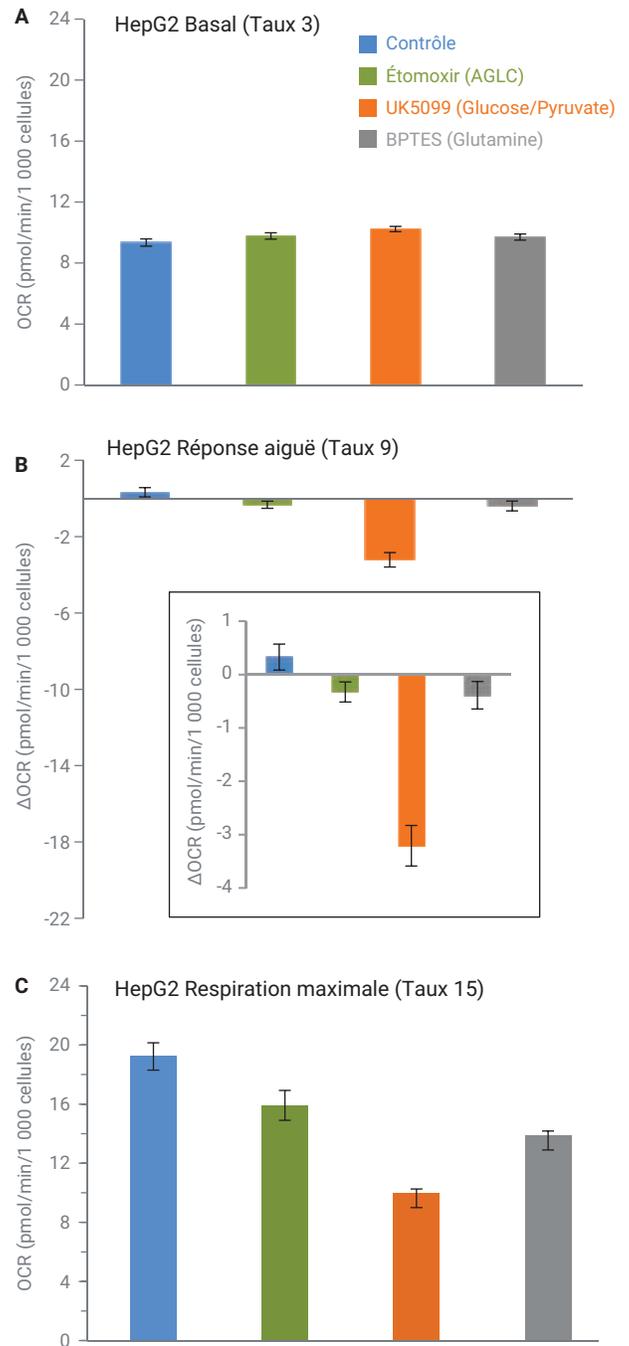
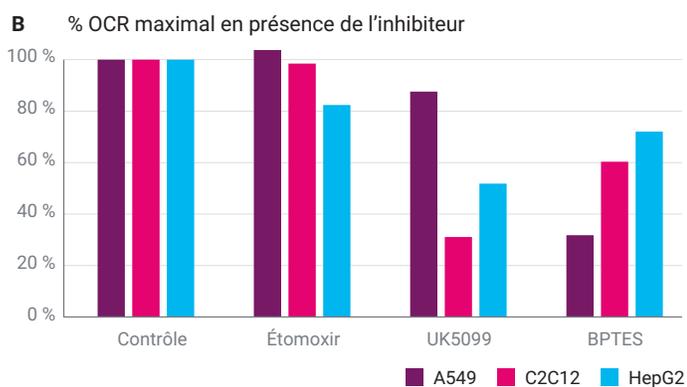
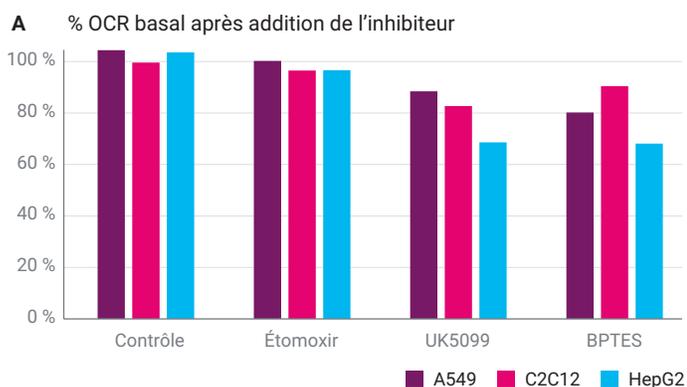


Figure 6. Exemple de paramètres de respiration basale, de réponse aiguë et de respiration maximale du test de stress oxydant du substrat chez des cellules HepG2. (A) Taux de respiration basale. (B) Réponse aiguë ; il est à noter que cette valeur est exprimée en tant que changement (Δ) de OCR par rapport au taux basal. (C). Taux de respiration maximale en présence de chacun des inhibiteurs. Les graphes et les valeurs sont dérivés du tracé cinétique de la Figure 5 obtenu par la méthode analytique Agilent Seahorse. Les mêmes paramètres ont été calculés pour les cellules A549 et C2C12 (données non présentées).



C

% OCR basal	AGLC (Étomoxir)	Glucose/Pyruvate (UK5099)	Glutamine (BPTES)
A549	100 %	88 %	80 %
C2C12	96 %	83 %	90 %
HepG2	97 %	69 %	68 %

D

% OCR maximal	AGLC (Étomoxir)	Glucose/Pyruvate (UK5099)	Glutamine (BPTES)
A549	104 %	88 %	32 %
C2C12	97 %	31 %	60 %
HepG2	82 %	52 %	72 %

Figure 7. Comparaison de l'oxydation du substrat pour les cellules A549, C2C12 et HepG2. (A) L'OCR basal après ajout de l'inhibiteur et (B) l'OCR maximal en présence de l'inhibiteur à partir des données de la Figure 5 par rapport à chaque inhibiteur. Les tableaux C et D résument les données des panels A et B, respectivement. Voir la section Méthodologie pour le calcul des pourcentages. On note une augmentation de la sensibilité aux inhibiteurs dans des conditions de respiration maximale (demande de substrat plus importante) par rapport à la réponse aiguë dans des conditions de respiration basale, ainsi que les réponses extrêmement différenciées aux inhibiteurs en fonction du type de cellules.

Pertinence de l'oxydation du substrat pour le métabolisme des cellules cancéreuses et immunitaires, découverte de médicaments et conseils d'applications

Il est primordial de comprendre les dépendances aux substrats afin de développer des offres thérapeutiques pour différentes maladies. En effet, l'exploration des gènes, des protéines et des voies qui modulent le métabolisme est une approche prometteuse pour le développement de nouvelles cibles pour un large éventail de maladies (Figure 8). Les données émergentes montrent que les métabolites, et notamment l'oxydation de substrats spécifiques des mitochondries peuvent affecter le phénotype de la cellule, les fonctions cellulaires telles que la prolifération et la différenciation, et provoquer des dysfonctionnements ou des maladies.⁵

La prolifération de cellules cancéreuses dépend de la disponibilité de substrats. Les substrats n'alimentent pas seulement les cellules cancéreuses pour les faire proliférer et devenir malignes, mais la disponibilité de certains substrats est une caractéristique clé du micro-environnement tumoral, influençant entre autres l'efficacité des chimiothérapies.¹⁰ En ce qui concerne le développement de médicaments, il est primordial de mieux comprendre la demande en substrats dans le métabolisme des cellules cancéreuses. Dans le traitement

du cancer, les stratégies thérapeutiques consistent à cibler plusieurs voies métaboliques telles que la glycolyse, le cycle de Krebs, le transport des électrons (TE), la phosphorylation oxydative (PhosOx) ainsi que l'oxydation du pyruvate, de la glutamine et des acides gras (Figure 1). Par exemple, alors que l'oxydation observée pour la glutamine était minimale chez les tumeurs pulmonaires de souris p53 KrasG12D,¹¹ de nombreuses études *in vitro* indiquent que l'oxydation de la glutamine joue un rôle majeur, notamment chez les cellules d'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC), indiquant que la respiration joue un rôle anabolique en stimulant la biosynthèse d'aspartate dans les cellules cancéreuses en prolifération.¹²

Il a été démontré que l'une des voies métaboliques bioénergétiques les plus utilisées dans les cellules du cancer de la prostate implique une plus grande capture du palmitate et l'oxydation d'acides gras, offrant ainsi une voie alternative pour répondre aux besoins bioénergétiques des cellules tumorales. En outre, de nouvelles données montrent que les cellules de tumeurs pancréatiques sont particulièrement dépendantes de la phosphorylation oxydative des mitochondries dans des conditions de faible apport en nutriments, et que le métabolisme des mitochondries représente une vulnérabilité métabolique majeure.¹²

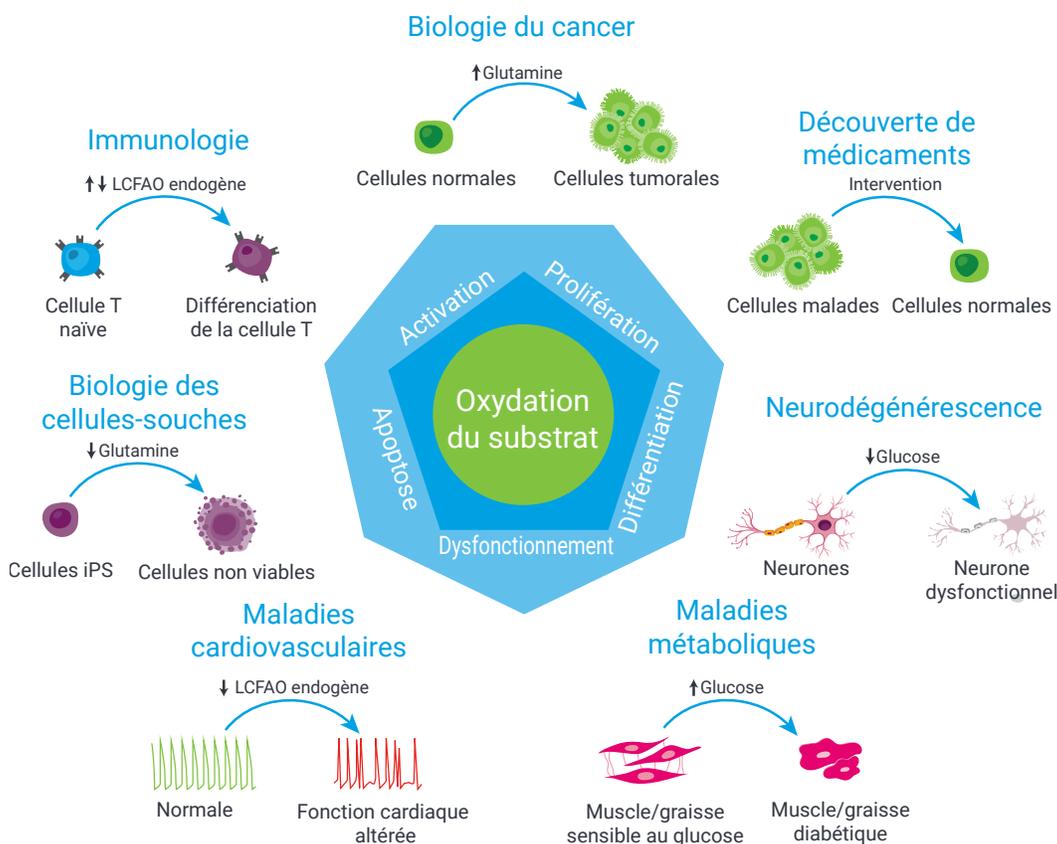


Figure 8. Exemples d'oxydation du substrat de mitochondries responsable du phénotype et de (dys)fonctions cellulaires. Les tests du stress oxydant du substrat Agilent Seahorse XF facilitent l'exploration de substrats spécifiques dans les mitochondries pour comprendre lesquels sont pertinents ou nécessaires au phénotype et aux fonctions de certaines cellules.

En ce qui concerne la méthodologie, la Figure 9A illustre un scénario possible pour tester plusieurs variants d'un type de cancer, qu'ils soient naturels ou issus du génie génétique, afin de comprendre si les cellules ont des « signatures » d'oxydation de substrats semblables ou uniques et si ces substrats sont impliqués dans la prolifération ou la transformation cellulaire. Ces informations peuvent aussi pointer des faiblesses métaboliques, facilitant ainsi la découverte de nouvelles thérapies.

On sait également que le métabolisme énergétique de la cellule influence de nombreuses voies métaboliques immunitaires et joue un rôle d'indicateur ou de contrôle de la fonction des cellules immunitaires et de l'engagement dans un lignage. Il est intéressant de noter que les métabolites peuvent influencer directement la différenciation et la fonction des cellules immunitaires.⁵ Par conséquent, la modification de la machine métabolique et de la production de certains métabolites peut réguler la fonction immunitaire. Par exemple, le métabolisme de la glutamine joue un rôle essentiel dans la polarisation des macrophages M2 en alimentant le cycle de Krebs, et favorise la production de phénotypes stables retrouvés dans la mémoire immune,¹³ alors qu'il a été observé que les cellules T positives de la mémoire centrale importent du glucose et du glycérol pour synthétiser des acides gras et des triglycérides qui sont ensuite hydrolysés par lipolyse pour alimenter l'oxydation des acides gras (OAG).¹⁴

En ce qui concerne les tests de fonction des cellules immunitaires et d'oxydation de substrats, la Figure 9B illustre comment les tests de stress oxydant du substrat XF peuvent

être utilisés avec divers types de cellules immunitaires (naïves, activées, cellules mémoires, etc.) pour explorer la dépendance ou l'assujettissement à un ou plusieurs substrats pour que la différenciation ou la fonction cellulaire soit normale, et éventuellement, comment le destin des cellules immunitaires pourrait être manipulé ou contrôlé par l'oxydation de certains substrats.

À ce stade, la programmation métabolique est en train d'émerger en tant que mécanisme essentiel pour modifier l'activation, la différenciation et la fonction des cellules immunitaires.¹⁵ Les divers besoins métaboliques des différentes cellules impliquées dans la réponse immunitaire offrent une opportunité unique de séparer phénotype et fonctions. Une des approches à l'immunothérapie anticancéreuse utilise la culture *ex vivo* et la manipulation génétique de cellules T autologues qui sont ensuite réinjectées par des protocoles de transfert adoptif, comme les traitements par cellules T porteuses de récepteurs d'antigènes chimériques (CAR). Dans ce cas, les cellules T sont génétiquement programmées pour exprimer des protéines chimériques qui relient des peptides d'anticorps anti-tumeur hautement spécifiques à des voies métaboliques stimulant l'activation des cellules T.³ Des études récentes ont tenté de cibler les cellules immunitaires suppressives telles que les cellules Treg intra-tumorales, les cellules suppressives d'origine myéloïde et les macrophages M2. Tous ces sous-ensembles sont particulièrement intéressants du fait de leurs profils métaboliques distincts, ce qui suggère qu'un relativement haut degré de spécificité de ciblage par manipulation génétique ou exposition à des médicaments est possible.³

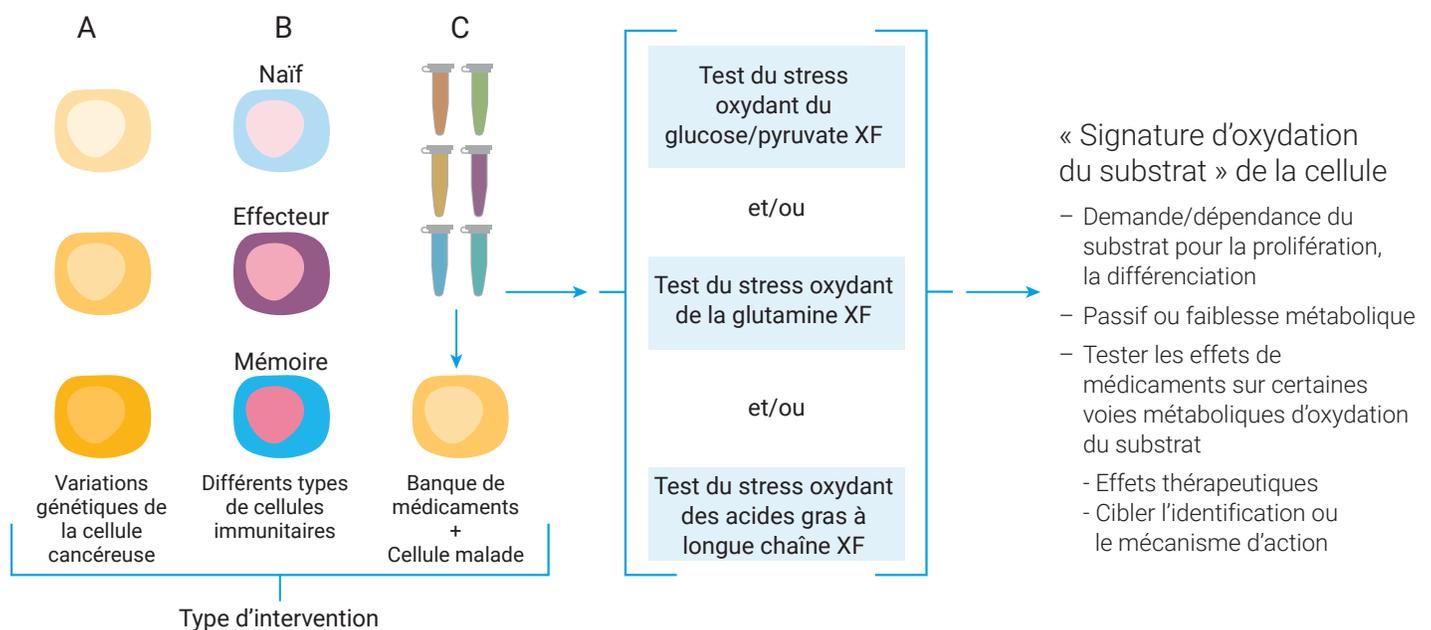


Figure 9. Exemples de conception de test de stress oxydant du substrat. Schémas expérimentaux potentiels d'application des tests de stress oxydant du substrat Agilent XF à (A) la biologie cellulaire du cancer, (B) la fonction des cellules immunitaires et (C) la recherche pour découvrir de nouveaux médicaments. Voir les résultats et la discussion pour plus d'informations.

Conclusion

En ce qui concerne la méthodologie pour tester les médicaments et leur développement, ces types de tests peuvent être utilisés pour analyser les effets de médicaments par rapport à des voies métaboliques d'oxydation de substrat spécifiques dans les mitochondries, soit pour comprendre les effets thérapeutiques éventuels des composés sur les cellules présentant des dysfonctionnements, soit pour faciliter l'identification de drogue ciblée et élucider le mécanisme d'action. Dans ce cas, les variables telles que le temps d'exposition au médicament (chronique ou aiguë) et la concentration du médicament pourront être explorées (Figure 9C).

Cette étude décrit la conception et la preuve de concept des tests de stress oxydant du substrat Agilent XF utilisés pour comprendre quels sont les substrats pertinents ou nécessaires pour avoir un phénotype spécifique ou des fonctions cellulaires particulières. Ces kits comprennent une suite de solutions optimisées, pratiques et rapides pour mesurer l'oxydation de substrats cellulaires en évaluant trois substrats majeurs alimentant les mitochondries : les acides gras à longue chaîne, le glucose/pyruvate et/ou la glutamine. Ces tests fournissent un grand nombre d'informations multi-paramétriques en temps réel que n'offrent pas les tests conventionnels de capture ou d'utilisation finale de substrats. Ce type de méthodologie est recommandé lorsque l'on veut savoir si la cellule présente une demande pour un ou plusieurs substrats en particulier, ou si l'on souhaite explorer l'effet d'une intervention au niveau de la cellule sur l'oxydation d'un substrat spécifique dans les mitochondries. Ces informations fonctionnelles facilitent l'étude de la manière dont les cellules modifient ou déportent l'oxydation des substrats pour assurer les fonctions cellulaires clés d'activation, de prolifération et de différenciation.

Phénotype de métabolisme quantitatif et d'énergie

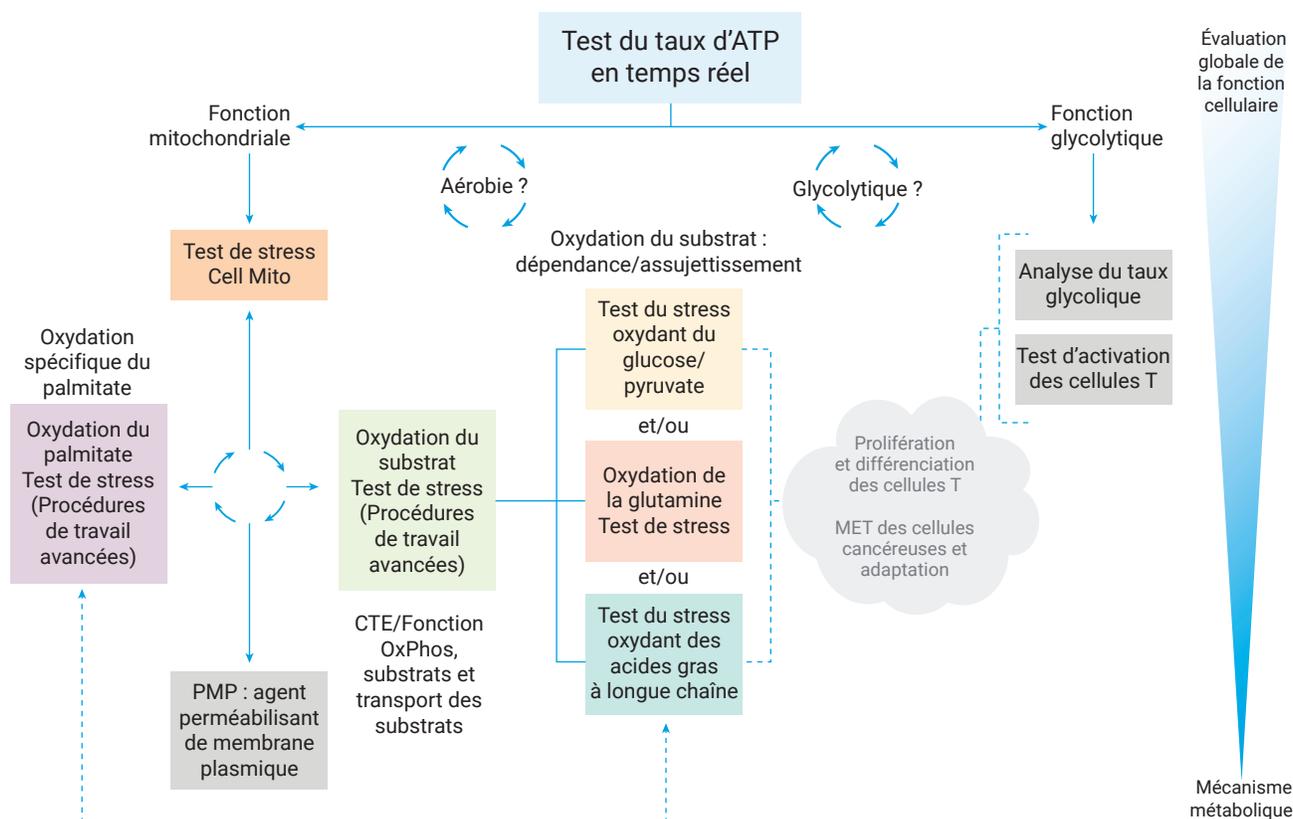


Figure S1. Agilent propose divers kits de test XF capables de fournir tout un spectre d'informations, allant d'une évaluation globale de la fonction cellulaire à des détails particuliers du mécanisme métabolique. Une fois qu'une modification de fonction mitochondriale a été identifiée, les prochaines étapes de l'exploration consistent à comprendre à quoi est dû ce changement, y compris les effets de l'oxydation du glucose/pyruvate, de la glutamine et des acides gras à longue chaîne.

Références

1. Marx, V. How to Follow Metabolic Clues to Find Cancer's Achilles Heel. *Nat. Methods* **2019**, *16*, 221–24.
2. Vander Heiden, M. G.; DeBerardinis, R. J. Understanding the Intersections Between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* **2017**, *168*, 657–69.
3. Beezhold, K.; Byersdorfer, C. A. Targeting Immuno-Metabolism to Improve Anti-Cancer Therapies. *Cancer Letters* **2018**, *414*, 127–35.
4. Corbet, C. Stem Cell Metabolism in Cancer and Healthy Tissues, Pyruvate in the Limelight. *Frontiers in Pharmacology* **2018**, *8*.
5. Patel, C. H. *et al.* Targeting Metabolism to Regulate Immune Responses in Autoimmunity and Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 669-88.
6. Divakaruni, A. S. *et al.* Etomoxir Inhibits Macrophage Polarization by Disrupting CoA Homeostasis. *Cell Metab.* **2018**, *28*, 490–503.e7.
7. Hildyard, J. C. *et al.* Identification and Characterisation of a New Class of Highly Specific and Potent Inhibitors of the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Biochim Biophys Acta* **2005**, *1707*, 221–30.
8. Robinson, M. M. *et al.* Novel Mechanism of Inhibition of Rat Kidney-Type Glutaminase by Bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES). *Biochemical Journal* **2007**, *406*, 407–14.
9. Divakaruni, A. S. *et al.* Analysis and Interpretation of Microplate-Based Oxygen Consumption and pH Data. *Methods Enzymol.* **2014**, *547*, 309-54.
10. Kalyanaraman, B. *et al.* a review of the Basics of Mitochondrial Bioenergetics, Metabolism, and Related Signaling Pathways in Cancer Cells, Therapeutic Targeting of Tumor Mitochondria with Lipophilic Cationic Compounds. *Redox Biology* **2018**, *14*, 316–27.
11. Kerr, E. M.; Martins, C. P. Metabolic Rewiring in Mutant Kras Lung Cancer. *Febs. J.* **2018**, *285*, 28–41.
12. Kalyanaraman, B. Teaching the Basics of Cancer Metabolism, Developing Antitumor Strategies by Exploiting the Differences Between Normal and Cancer Cell Metabolism. *Redox Biology* **2017**, *12*, 833–42.
13. Viola, A. *et al.* The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Frontiers in Immunology* **2019**, *10*.
14. Raud, B. *et al.* Fatty Acid Metabolism in CD8(+) T Cell Memory: Challenging Current Concepts. *Immunological Reviews* **2018**, *283*, 213–31.
15. Domínguez-Andrés, J.; Joosten, L. A. B.; Netea, M. G. Induction of Innate Immune Memory: The Role of Cellular Metabolism. *Current Opinion in Immunology* **2019**, *56*, 10–16.

www.agilent.com/chem

**Destiné à la recherche uniquement.
Ne pas utiliser à des fins de diagnostic.**

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Imprimé aux États-Unis, le 19 décembre 2019
5994-1623FR
DE.5391782407

