



HAL
open science

Métabolisme des tumeurs : apport de la modélisation dans la compréhension de l'adaptabilité spatiotemporelle

Pierre Jacquet

► **To cite this version:**

Pierre Jacquet. Métabolisme des tumeurs : apport de la modélisation dans la compréhension de l'adaptabilité spatiotemporelle. Cancer. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. <NNT : 2022GRALS025>. <tel-03937196>

HAL Id: tel-03937196

<https://theses.hal.science/tel-03937196v1>

Submitted on 13 Jan 2023

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.



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : ISCE - Ingénierie pour la Santé la Cognition et l'Environnement

Spécialité : MBS - Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement

Unité de recherche : Translational Innovation in Medicine and Complexity

Métabolisme des tumeurs : apport de la modélisation dans la compréhension de l'adaptabilité spatiotemporelle

Tumour metabolism: modelling for understanding spatiotemporal adaptability

Présentée par :

Pierre JACQUET

Direction de thèse :

Angélique STEPHANOU
Université Grenoble Alpes

Directrice de thèse

Rapporteurs :

OLIVIER GANDRILLON
Directeur de recherche, CNRS DELEGATION RHONE AUVERGNE
MATHILDE BADOUAL
Professeur des Universités, UNIVERSITE DE PARIS-CITE

Thèse soutenue publiquement le **9 novembre 2022**, devant le jury composé de :

OLIVIER GANDRILLON Directeur de recherche, CNRS DELEGATION RHONE AUVERGNE	Rapporteur
MATHILDE BADOUAL Professeur des Universités, UNIVERSITE DE PARIS-CITE	Rapporteuse
PATRICIA THEBAULT Professeur des Universités, UNIVERSITE DE BORDEAUX	Examinatrice
LOREN COQUILLE Maître de conférences, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES	Examinatrice
OLIVIER FRANÇOIS Professeur des Universités, GRENOBLE INP	Président du Jury



Résumé

L'effet Warburg souvent présenté dans la littérature comme une caractéristique métabolique intrinsèque du cancer fait l'objet de nombreuses recherches pour comprendre son origine. Pourtant, si cette surproduction d'acide lactique est observée depuis longtemps au sein des tumeurs, elle ne représente qu'une partie des états métaboliques adoptables et adoptés par les cellules cancéreuses. Le travail réalisé pendant cette thèse a eu pour objectif d'apporter des éléments de réponse concernant l'émergence de l'hétérogénéité spatiotemporelle du métabolisme énergétique tumorale. Cette problématique a été abordée au travers d'une approche épistémologique et par la modélisation en étendant un modèle existant fondé sur des données expérimentales. L'effet Warburg et les termes associés comme la *glycolyse aérobie*, la notion de *switch métabolique* ou de *reprogrammation métabolique* sont ainsi remis en question au travers des différences d'interprétation au sein de la littérature et en observant une dérive sémantique et conceptuelle de ces termes depuis les observations d'Otto Warburg en 1956.

Le modèle développé est un modèle hybride, combinaison de formalismes discrets (prise en compte de cellules autonomes et des processus cellulaires associés) et continus (métabolisme, diffusions des substrats qui définissent l'environnement - oxygène, glucose et lactate et l'acidité dont le rôle souvent négligé est mis en lumière dans cette thèse). Il permet de simuler, en 2D (et 3D), un sphéroïde tumoral composé de milliers de cellules ayant leurs caractéristiques propres. Le sphéroïde est un modèle expérimental classiquement étudié qui sert ici de référence et étudié en parallèle au sein de notre équipe à partir de cellules issues de gliomes. Le modèle permet de mettre en évidence au travers de plusieurs simulations, les conséquences sur le tissu tumoral des variations de l'environnement (déplétions passives des substrats, hypoxie cyclique, chocs acides ou déprivation de glucose) et d'apporter ainsi une nouvelle compréhension sur la régulation du métabolisme.

Les résultats obtenus mettent tout d'abord en avant l'importance du couple pyruvate-lactate dans la régulation des voies énergétiques du métabolisme tumoral. L'intégration de l'influence de l'acidité dans le modèle, fondée sur des observations expérimentales récentes, montre qu'elle est un facteur clé de la régulation de ces voies énergétiques. Ainsi la dichotomie respiration/fermentation classiquement présentée dans la littérature n'a pas lieu d'être, les cellules modulant la proportion de ces deux modes de production d'énergie de manière continue, progressive et spatialement hétérogène, à l'opposé d'une bascule rapide et irréversible. De plus, il a émergé une forme de coopération entre cellules pouvant s'apparenter à l'effet Warburg inverse. Il en résulte que l'effet Warburg n'est finalement pas une caractéristique universelle du métabolisme tumoral, mais une manifestation métabolique contextuelle et transitoire. Le paysage métabolique du système cellule-environnement détermine alors dynamiquement la capacité des cellules à survivre aux conditions extérieures et les régulations épigénétiques modulent leur potentiel de déplacement au sein de ce paysage. Sans écarter le rôle important des mutations génétiques au sein des cellules tumorales, les résultats montrent qu'elles ne sont pas systématiquement nécessaires pour faire émerger des modes métaboliques extrêmes et/ou caractérisés comme pathologiques. Ce travail apporte de nouvelles manières d'aborder la question du métabolisme afin d'adopter plus tard, des stratégies thérapeutiques adaptées non seulement aux spécificités tissulaires de chaque patient, mais également de penser une tumeur comme un écosystème complexe ne se limitant pas à sa variété génétique.

À mon fils, Raphaël, pour ses rires et ses sourires,

À mon épouse, Pauline, pour sa confiance, son soutien et son affection,

À mon père, dont la rigueur de pensée et la droiture m'ont encouragé à donner le meilleur de moi-même,

À mon grand-père, André, qui m'a transmis la joie de chercher la Vérité,

À l'ensemble de ma famille pour leur présence indéfectible et leur amour...

je dédie cette thèse.

Remerciements

Il est difficile de formuler par écrit, des remerciements de sorte qu'ils retranscrivent suffisamment bien ma gratitude et l'affection que je porte aux personnes que je m'apprête à mentionner.

Ce document est le fruit de trois ans et demi de recherche, d'apprentissage et de questionnements. Si les idées, réflexions et concepts qui y sont développés, sont formulés par mes soins, ils sont en réalité le reflet d'une manière d'envisager le Vivant que j'ai accueillie et partagée en venant à Grenoble auprès de ceux qui sont devenus mes amis.

La première d'entre eux est ma directrice de thèse, Angélique Stéphanou, sans qui tout ce travail n'aurait jamais été possible. C'est en 2018 à Bordeaux, après avoir assisté à une présentation de ses travaux de recherche que j'ai souhaité réaliser mon stage de Master à ses côtés. Elle a tout de suite accepté et m'a proposé de poursuivre en thèse sur le même sujet. Elle m'a initié à la modélisation mathématique et m'a laissé explorer librement différentes voies pour éprouver mon raisonnement, mes doutes et mes certitudes. Ses encouragements, sa rigueur scientifique, son soutien et sa bonne humeur m'ont réellement aidé à avancer.

Ce sont également des personnes comme Ibrahim Cheddadi et Nicolas Glade, pour tous leurs conseils, leur écoute et pour toutes les discussions enflammées, scientifiques ou non, autour d'un sandwich le midi. Rémi, Alaa et Kévin qui ont partagé le même bureau et supporté mes gesticulations en réalité virtuelle.

Je remercie également les membres du Jury, Olivier François qui a accepté d'être président du Jury ainsi que Mathilde Badoual et Olivier Gandrillon, mes rapporteurs, dont les observations m'ont guidé dans la construction de ma soutenance. Je remercie Patricia Thébault et Loren Coquille d'avoir examiné ma thèse et apporté leurs expertises. Aux membres du Jury ensemble, je tiens à signifier le plaisir que j'ai eu de discuter avec eux le jour de la soutenance et suis reconnaissant pour l'intérêt marqué qu'ils ont porté à mes travaux.

Plus généralement, je remercie tous ceux qui, par leurs présentations au cours de séminaires, conférences, discussions, m'ont fait froncer les sourcils, ont élargi mon regard sur la science et présenté de nouvelles manières de penser. Je pense bien sûr à toute l'équipe BCM (feu DyCTiM) et particulièrement aux membres de mon comité de suivi de thèse, Frédéric Thomas et Jean-Luc Gouzé.

Enfin, je remercie le lecteur présent qui s'intéressera à ce document avec un esprit ouvert et le lecteur futur qui pardonnera mon manque de recul et de connaissances.

Table des matières

Table des matières	vii
Introduction	1
1 Le métabolisme et les tumeurs	5
1.1 Principe de voies métaboliques et production d'énergie	5
1.1.1 Voies de production d'énergie	7
1.1.2 Délimitations des voies métaboliques et réseaux	9
1.2 Singularité tumorale	10
1.2.1 Caractéristiques générales des cancers	11
1.2.2 Mutations génétiques	13
1.2.3 Le métabolisme et l'effet Warburg	15
1.3 Paysage métabolique	19
1.3.1 États transitoires, états stationnaires et états d'équilibres	20
1.3.2 Homéostasie et atteignabilité	23
2 Considérations épistémologiques	25
2.1 Évolution de la littérature - le métabolisme tumoral de Warburg à nos jours	25
2.1.1 Observation de Warburg en 1956	25
2.1.2 Glycolyse aérobie et la notion de switch	30
2.1.3 "Reverse Warburg effect" et la remise en question d'un phénotype universel	32
2.2 Anthropomorphisme et cellule	35
2.2.1 La reprogrammation métabolique	36
2.3 La place de la cellule tumorale dans l'évolution	40
2.3.1 L'évolution à l'échelle d'un cancer	41
2.3.2 Le cancer dans l'évolution	42
3 Modélisation multi-échelle d'une tumeur	45
3.1 Modèles mathématiques du métabolisme	46
3.1.1 Modèles stœchiométriques	46
3.1.2 Modèles cinétiques	48
3.2 Modèles computationnels	51
3.2.1 Modèles individus-centrés	52
3.3 Choix de référence expérimentale et de modèle hybride	54
3.4 Intégration des différentes échelles biologiques	62
3.4.1 Échelle environnementale	63
3.4.2 Échelle biochimique	66
3.4.3 Échelle génétique/épigénétique	75
3.4.4 Échelle cellulaire	77
3.4.5 Échelle tissulaire	78
3.4.6 Choix de programmation	80

4	Conséquences des conditions environnementales sur le métabolisme tumoral	85
4.1	Simulation de référence	86
4.1.1	Conditions initiales	86
4.1.2	Morphologie tissulaire	87
4.1.3	Gradients et profils radiaux	88
4.1.4	Phénotypes émergents	91
4.1.5	Paysage métabolique	93
4.2	Oscillations d'oxygène	95
4.3	Chocs acides	102
4.4	Déplétion de glucose	107
4.5	Complexité des comportements émergents	111
4.5.1	Complexité morphologique	111
4.5.2	Complexité métabolique	114
4.5.3	Complexité des interactions	118
4.5.4	Influence du réseau de régulation génétique	124
4.6	Bilan des résultats	126
	Conclusions et perspectives	129
A	Annexes	133
A.1	Articles acceptés	133
A.2	Article soumis	164
A.3	Profils de pH intracellulaire en fonction du pH extracellulaire	183
A.4	Équations du modèle du chapitre 4	184
	Bibliographie	197

Table des figures

1.1	Santorio et sa balance assise	5
1.2	Otto Warburg en 1966	6
1.3	Carte du métabolisme	7
1.4	Les dix réactions de la glycolyse	8
1.5	La phosphorylation oxydative	8
1.6	Les réactions du cycle de Krebs	9
1.7	Exemples de configurations de voies métaboliques à partir d'un réseau à 5 métabolites	10
1.8	Cellule du cancer du sein photographié par microscopie électronique	11
1.9	Embranchement métabolique issue du pyruvate	17
1.10	<i>"The Landscape of Cancer Metabolism Oscillation"</i>	23
2.1	Nuage des mots clés renseignés par les auteurs des articles traitant de l'effet Warburg .	26
2.2	Prémises amenant à la définition moderne de l'effet Warburg	27
2.3	Évolution thématique : mots clés sur l'effet Warburg coassociés au sein des articles . .	30
2.4	"Reverse Warburg effect" :	32
2.5	Evolution du nombre de publications associés aux termes "metabolic reprogramming" et "metabolic switch" :	33
2.6	Représentation schématique de l'adaptabilité métabolique	39
2.7	Diabètes de Tasmanie	40
3.1	Exemple d'un set de réactions biochimiques.	46
3.2	Vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat pour différentes lois enzymatiques	48
3.3	Automate cellulaire	52
3.4	Modèle cellulaire de Potts	52
3.5	Modèle basé sur les sommets	52
3.6	Modèle basé sur les centres	53
3.7	Modèle CBM de carcinome canalaire généré avec PhysiCell	53
3.9	Sphéroïde dans une plaque de 96 puits	54
3.8	Sphéroïde observé par microscopie confocale	54
3.10	Premier modèle réalisé	55
3.11	Deuxième modèle réalisé	57
3.12	Cancer Gene-Metabolism Integrative Network	59
3.14	Relation entre les différents types de modèles choisis	61
3.13	Structure du modèle réalisé	61
3.15	Échelle de temps des différents éléments de la simulation	62
3.16	Domaine de diffusion représenté par les 4 substrats extracellulaires présents	63
3.17	Structure moléculaire d'un transporteur monocarboxylate 4 (MCT4)	64
3.18	Évolution de l'activité enzymatique relative par rapport au pH	68

3.19 Flux entrant et sortant de lactate et de protons en fonction de la concentration extracellulaire de lactate	73
3.20 Exemple de tirage de nouvelles valeurs de gamma	76
3.21 Cycle cellulaire utilisé dans la simulation	77
3.22 Chevauchement des cellules dans le simulateur	79
3.23 Itérations pour définir un profil de densité cellulaire	80
3.24 Simulation 2D issue du premier modèle réalisé	82
3.25 Simulation 3D issue du premier modèle réalisé	83
3.26 Interface de simulation Shiny	83
3.27 Exemples de représentations intégrées dans l'interface de simulation	84
3.28 Logiciel DIVE	84
4.1 Rappel des voies métaboliques abordées	86
4.2 Sphéroïde de cellules F98	87
4.3 Croissance du sphéroïde de la simulation 1	87
4.4 Profile de densité en fin de simulation du sphéroïde de la simulation 1 à 400h	88
4.5 Répartition des états cellulaires du sphéroïde de la simulation 1 au cours du temps	88
4.6 Évolution de la population cellulaire dans le sphéroïde de la simulation 1	89
4.7 Profils radiaux moyens des concentrations en substrats dans l'environnement de la simulation 1 au cours du temps	89
4.8 Force de régulation du lactate sur l'expression d'HIF à 400 h	91
4.9 Phénotypes des cellules du sphéroïde de la simulation 1 au cours du temps	92
4.10 Effet Warburg et Warburg inverse des cellules du sphéroïde de la simulation 1 au cours du temps	92
4.11 Évolution du paysage métabolique du tissu de la simulation 1 au cours du temps	94
4.12 Répartition de la densité cellulaire dans la bifurcation LDH/PDH de la simulation 1 à 30 h.	95
4.13 Profils radiaux moyens des concentrations en substrats et pH dans l'environnement au cours de cycles d'hypoxies.	96
4.14 Évolution de la population cellulaire dans le sphéroïde au cours de cycles d'hypoxies.	98
4.15 Évolution de la proportion des phénotypes métaboliques dans le sphéroïde avec ou sans cycles d'hypoxies.	99
4.16 Évolution de la proportion d'effet Warburg et Warburg inverse dans le sphéroïde avec ou sans cycles d'hypoxies.	101
4.17 Paysages métaboliques et expression de l'effet Warburg avant et après le changement de pH dans l'ensemble de l'environnement	103
4.18 Évolution de la proportion des phénotypes métaboliques dans la population des sphéroïdes au cours du temps avant et après le changement de pH dans l'ensemble de l'environnement.	105
4.19 Évolution des états cellulaires au sein de la population des sphéroïdes au cours du temps avant et après le changement de pH dans l'ensemble de l'environnement	106
4.20 Profils radiaux moyens des concentrations en substrats dans l'environnement avant et après déplétion de glucose à 60 h	107
4.21 Évolution des états cellulaires au sein de la population des sphéroïdes au cours du temps avant et après la chute de glucose dans l'ensemble de l'environnement	109

4.22	Évolution de la proportion des phénotypes métaboliques et de l'expression de l'effet Warburg dans la population cellulaire au cours du temps avant et après la baisse de concentration en glucose dans l'ensemble de l'environnement.	110
4.23	Croissance du sphéroïde de la simulation 2	112
4.24	Croissance du sphéroïde de la simulation 3	112
4.25	Croissance du sphéroïde de la simulation 4	113
4.26	Croissance du sphéroïde de la simulation 5	113
4.27	Croissance du sphéroïde de la simulation 5 bis	114
4.28	Répartition des états cellulaires des sphéroïdes des fins de simulation 2, 3 et 4	115
4.29	Profils radiaux moyens des concentrations en substrat dans l'environnement de la simulation 2 au cours du temps	115
4.30	Concentrations des substrats et pH médians dans l'environnement de la simulation 3 au cours du temps	116
4.31	Évolution de la valeur médiane de concentration d'oxygène dans l'environnement et du nombre de cellules en vie dans la simulation 3	117
4.32	Répartition des états cellulaires du sphéroïde de la simulation 6 à 420 h	120
4.33	Phénotypes cellulaires du sphéroïde de la simulation 6 à 420h	121
4.34	Concentrations extracellulaires dans la simulation 6 à 420h	121
4.35	Flux de la réaction catalysée par LDH (r12) et de transport du lactate via les canaux MCT (r21) dans le sphéroïde de la simulation 6 à 420h	122
4.36	Évolution du paysage métabolique du tissu de la simulation 6 et 6 bis au cours du temps	123
4.37	Densité cellulaire dans la bifurcation LDH/PDH de la simulation 6 à 130h	124

Liste des tableaux

3.1	Réactions métaboliques intégrées dans le modèle	67
4.1	Paramètres généraux des simulations 1 à 5	86
4.2	Paramètres généraux de la simulation 1	92
4.3	Paramètres généraux de la simulation 2	111
4.4	Paramètres généraux de la simulation 3 et 4	111
4.5	Paramètres généraux de la simulation 5 et 5 bis	114
4.6	Tendances générales du comportement métabolique en fonction des conditions extérieures	118
4.7	Paramètres généraux de la simulation 6	119

Introduction

Le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses fait l'objet de recherches approfondies depuis plus de cinquante ans [1], mais les mécanismes régissant le métabolisme des tumeurs ne sont pas clairement compris. L'effet Warburg notamment, qui semble désormais accepté comme une caractéristique clé de nombreux types de cancer, est considéré par certains comme une cause fondamentale possible du cancer [2, 3]. Certains définissent cet effet comme une production élevée de lactate malgré un apport suffisant en oxygène [4]. Cependant, selon les premières observations de Warburg dans les années 1920, l'effet se limite à la production par la tumeur d'une grande quantité de lactate (indépendamment de la présence d'oxygène) [5, 6].

Le microenvironnement des tumeurs est souvent associé à des conditions hypoxiques qui favorisent un régime glycolytique conduisant à une acidification du milieu. Il est aujourd'hui bien connu qu'un pH acide favorise l'invasion des cellules tumorales. L'effet Warburg se manifeste alors par l'élévation significative des concentrations en lactate. La question centrale alors posée dans la littérature est "pourquoi les tumeurs fermentent autant?" [7-10]. La recherche d'une réponse à cette question est encouragée par les multiples implications thérapeutiques potentielles. Cependant, cette problématique occulte parfois la pluralité des états métaboliques présents au sein d'un tissu. De la même manière que les profils génétiques des cancers sont hétérogènes entre types de cancers, entre individus et au sein d'un même tissu tumoral, le métabolisme manifeste également cette hétérogénéité [11]. Il varie entre les cellules au sein du même tissu mais évolue également au cours de la vie de la tumeur. Le métabolisme cellulaire très complexe, implique de nombreux processus différents en constante interaction.

Dans ce contexte, un modèle théorique est un moyen puissant et efficace de donner du sens à cette complexité et d'aborder la temporalité. Il permet de tester la pertinence de nouvelles hypothèses et de mettre en évidence des propriétés émergentes qui ne sont pas intuitives par nature, afin de fournir une meilleure compréhension du fonctionnement intrinsèque des processus métaboliques et également de fournir de nouvelles perspectives pour guider les recherches futures.

En 2019, j'ai réalisé mon stage de fin de Master sur la modélisation de l'effet Warburg. J'ai réalisé un modèle simple illustrant l'im-

[1]: [DeBERARDINIS et al.](#) (2016), « Fundamentals of cancer metabolism »

[2]: [DEVIC](#) (2016), « Warburg effect - a consequence or the cause of carcinogenesis? »

[3]: [BHAT et al.](#) (2011), « Can metabolic plasticity be a cause for cancer? Warburg-Waddington legacy revisited »

[4]: [BEEK](#) (2018), « The dynamic side of the Warburg effect : glycolytic intermediate storage as buffer for fluctuating glucose and O2 supply in tumor cells »

[5]: [MOOKERJEE et al.](#) (2017), « Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements »

[6]: [VAZQUEZ et al.](#) (2010), « Catabolic efficiency of aerobic glycolysis : The Warburg effect revisited »

[7]: [PARKS et al.](#) (2020), « Lactate and Acidity in the Cancer Microenvironment »

[8]: [LIBERTI et al.](#) (2016), « The Warburg Effect : How Does it Benefit Cancer Cells? »

[9]: [GATENBY et al.](#) (2004), « Why do cancers have high aerobic glycolysis? »

[10]: [GILLIES et al.](#) (2008), « Causes and Consequences of Increased Glucose Metabolism of Cancers »

[11]: [GENTRIC et al.](#) (2017), « Heterogeneity in Cancer Metabolism : New Concepts in an Old Field »

portance du pyruvate dans la répartition des flux métaboliques vers la respiration ou la fermentation. Au cours de ce stage cependant, il m'a semblé que la question de l'effet Warburg dépassait la dimension purement biologique et que des réflexions d'ordres épistémologiques devaient être abordées pour évaluer les multiples définitions et concepts auquel il est associé. C'est sur ces bases que ma thèse a débuté avec comme objectif de réaliser un modèle plus complet de l'hétérogénéité métabolique dont l'effet Warburg fait partie.

La thèse aborde donc ces questions au travers de deux approches complémentaires, une épistémologique afin de clarifier la problématique du métabolisme tumoral et par la modélisation pour répondre aux questions spécifiquement identifiées. La thèse s'articule ainsi en quatre chapitres. Dans le chapitre 1, après un bref aperçu de l'histoire du métabolisme, la biochimie des principales voies métaboliques de production d'énergie est présentée. Ensuite les caractéristiques générales différenciant les cancers des cellules saines seront décrites et l'accent sera mis sur celles concernant le métabolisme et l'effet Warburg plus particulièrement. La notion de continuité et de transitions entre états sera explicitée *via* la description des paysages métaboliques.

Dans le chapitre 2, l'effet Warburg et les termes associés comme la *glycolyse aérobie* ou la notion de *switch métabolique*, détaillés biologiquement dans le premier chapitre seront rediscutés d'un point de vue épistémologique. Ce chapitre s'attachera notamment à montrer la dérive sémantique et conceptuelle de ces termes en partant des observations d'Otto Warburg en 1956 jusqu'à nos jours. La question sera ensuite posée de la pertinence du terme fréquemment employée de *reprogrammation métabolique*. Enfin la place de la cellule tumorale au sein de l'évolution Darwinienne sera évoquée.

Le chapitre 3, détaillera les différents éléments constituant le modèle de sphéroïde tumoral développé dans cette thèse. Dans un premier temps, les types de modèles mathématiques et computationnels fréquemment utilisés dans la modélisation des tumeurs seront présentés. Les choix de modélisation seront ensuite détaillés, pour parvenir à un modèle hybride couplant des formalismes discrets (caractérisés par les différents algorithmes gérant les comportements cellulaires) et continus (équations différentielles du métabolisme et diffusion de molécules). L'intégration de ces éléments a lieu sur différentes échelles biologiques allant des réseaux de régulation génétique jusqu'à la mécanique tissulaire et la diffusion de substrats dans l'environnement.

Le chapitre 4, présente les résultats obtenus à partir du modèle. Une première simulation est réalisée dans des conditions proches

d'expériences réalisées *in vitro* sur sphéroïdes. L'évolution de l'environnement avec notamment la baisse progressive de l'oxygénation est observée et les conséquences sur les cellules sont évaluées au travers de la morphologie du tissu, la répartition des états cellulaires et les phénotypes métaboliques émergents. Ensuite la robustesse du métabolisme aux variations cycliques ou brusques des conditions environnementales sera éprouvée. Au cours de ces simulations le déplacement des cellules au sein du paysage métabolique donnera des indications sur la localisation d'attracteurs associés aux états essentiellement fermentatoires ou oxydatifs. La fin du chapitre, sera consacrée à des simulations faisant émerger des comportements complexes avec notamment des phénomènes de coopérations métaboliques entre cellules du sphéroïde modélisé.

Cette thèse utilise un modèle de document un peu particulier, inspiré des livres d'Edward Tufte [12] qui a réalisé un travail remarquable dans l'étude du design de l'information et de la présentation des données graphiques. Les marges sont élargies pour y intégrer des notes, annotations et figures qui soutiennent le texte adjacent.

[12]: TUFTE (2001), *The Visual Display of Quantitative Information*

Le métabolisme et les tumeurs

1

1.1 Principe de voies métaboliques et production d'énergie

Le métabolisme est l'ensemble des réactions biochimiques ayant lieu au sein des êtres vivants. On parle d'anabolisme pour désigner les voies de biosynthèse et de catabolisme pour les voies de dégradation. Les enzymes sont au cœur de ces réactions biochimiques par leur catalyse (c'est-à-dire la gestion de leur cinétique).

Lorsque plusieurs réactions biochimiques s'enchaînent successivement on parle de voie métabolique. Une voie métabolique peut regrouper l'ensemble des réactions qui contribue à une ou plusieurs grandes fonctions mais ce découpage / dichotomie reste arbitraire, ou du moins ne correspond pas à une réelle séparation biologique. En effet, chaque intervenant moléculaire au sein de ces voies métaboliques peut également participer à des réactions au sein d'autres voies / fonctions. Ce découpage permet néanmoins d'identifier des grands axes de régulation, isoler des fonctions biologiques et faciliter l'exploration du métabolisme.

L'étude du métabolisme moderne découle directement de celle de la physiologie expérimentale mais trouve son origine conceptuelle dans l'Antiquité, chinoise (yin et yang et les cinq phases), grecque (théorie des humeurs : décrite par Hippocrate) ou encore indienne (trois humeurs). Bien entendu, il n'était pas alors question de réactions chimiques mais de principes vitaux censés alimenter le vivant, lui insuffler une dynamique et expliquer la présence de déséquilibre. Cette vision conceptuelle perdura longtemps dans de nombreuses régions du monde et finit par être abandonnée progressivement en Europe jusqu'au XIX^{ème} siècle. C'est cependant avec Santorio Santorio⁽¹⁵⁶¹⁻¹⁶³⁶⁾ qu'un proto-métabolisme se décline sous formes de paramètres quantifiables. Pour lui la bonne santé du corps reposait sur le maintien des échanges (apport et excrétion) de l'organisme. Il mesura pendant plus de trente ans la variation de son poids avant, pendant et après ses repas en confectionnant un siège faisant office de balance (figure 1.1). Il mit en évidence la perspiration qui constitue la majeure partie de la chaleur évacuée par le corps [13].

La liste des scientifiques ayant contribué à l'émergence du champ d'étude qu'est le métabolisme est très longue et il serait illusoire de vouloir en faire une liste exhaustive ici. Il me semble cependant important d'en citer quelque-uns qui permirent de faire de cette

1.1	Principe de voies métaboliques et production d'énergie	5
1.1.1	Voies de production d'énergie	7
1.1.2	Délimitations des voies métaboliques et réseaux	9
1.2	Singularité tumorale . .	10
1.2.1	Caractéristiques générales des cancers	11
1.2.2	Mutations génétiques .	13
1.2.3	Le métabolisme et l'effet Warburg	15
1.3	Paysage métabolique .	19
1.3.1	États transitoires, états stationnaires et états d'équilibres	20
1.3.2	Homéostasie et atteignabilité	23



FIGURE 1.1 – Santorio et sa balance assise - Medicina Statica (1614)

[13]: MARTINEAUD et al. (1964), « Mesure de la perspiration insensible et des températures cutanées chez l'obèse dans les conditions basales »



FIGURE 1.2 – Otto Warburg en 1966 - Photo prise lors de la rencontre des prix Nobel à Lindau en 1966 - Photo colorisée

[14]: MEDINA (2020), « Metabolic Re-programming is a Hallmark of Metabolism Itself »

[15]: NICHOLSON (2005), « From metabolic pathways charts to animaps in 50 years »

discipline ce qu'elle est aujourd'hui. Antoine de Lavoisier⁽¹⁷⁴³⁻¹⁷⁹⁴⁾ fonda les bases de la chimie moderne et permis également d'établir le rapport entre respiration, production de dioxyde de carbone et thermogenèse. Louis Pasteur⁽¹⁸²²⁻¹⁸⁹⁵⁾ montra vers 1860, que les microorganismes provoquaient physiologiquement la fermentation alcoolique.

Quelque années plus tard en 1897, Eduard Buchner⁽¹⁸⁶⁰⁻¹⁹¹⁷⁾ identifie des molécules particulières permettant la fermentation (et de manière plus générale les autres réactions au sein des cellules) : les enzymes. Cet évènement marqua le début de la biochimie. Gustav Embden⁽¹⁸⁷⁴⁻¹⁹³³⁾ et Otto Fritz Meyerhof⁽¹⁸⁸⁴⁻¹⁹⁵¹⁾ découvrirent au début du XX^{ème} siècle les étapes constituant la glycolyse, permettant la transformation du glucose en pyruvate. En 1924, Otto Warburg⁽¹⁸⁸³⁻¹⁹⁷⁰⁾ décrit ses observations sur le métabolisme du cancer et sur leur surproduction d'acide lactique, indiquant un processus de fermentation anaérobie du glucose. Ses observations et les recherches qui en découlent seront décrites en détail plus loin dans ce manuscrit. Un de ses étudiants, Hans Krebs⁽¹⁹⁰⁰⁻¹⁹⁸¹⁾ décrit en 1937 les réactions constituant le cycle de l'acide citrique après avoir décrit celui de l'urée, réactions prenant place dans la mitochondrie et intervenant dans la respiration cellulaire.

Lorsque James Watson⁽¹⁹²⁸⁻⁾ et Francis Crick⁽¹⁹¹⁶⁻²⁰⁰⁴⁾ décrivent la structure de l'ADN en 1953, le monde de la recherche se tourne avec grand intérêt vers ce nouveau champ d'étude, la biologie moléculaire. Il s'ensuivit une vision "génocentrée" [14] du métabolisme jusqu'au début des années 2000, soumise presque exclusivement à la machinerie génétique et occultant parfois les principes de thermodynamique. Ce point sera également traité dans le chapitre 2. Les avancées technologiques qui ont émergées et leur utilisation dès les années 50 ont néanmoins permis des avancées majeures dans la compréhension du métabolisme. On peut citer notamment la spectroscopie RMN, la cristallographie aux rayons X appliquée aux macromolécules ou la labellisation par isotopes radioactifs. Les premières cartes du métabolisme commencent à être constituées dès 1965 [15] (la plus récente est présentée figure 1.3).

Depuis une vingtaine d'année, les approches multi-omiques et computationnelles donnent un regain d'intérêt pour le métabolisme, notamment via la protéomique, métabolomique ou encore les simulations et algorithmes d'optimisations de flux. Aujourd'hui, La base de donnée reactome [16] répertorie 13890 réactions et 2546 voies métaboliques chez l'Homme.

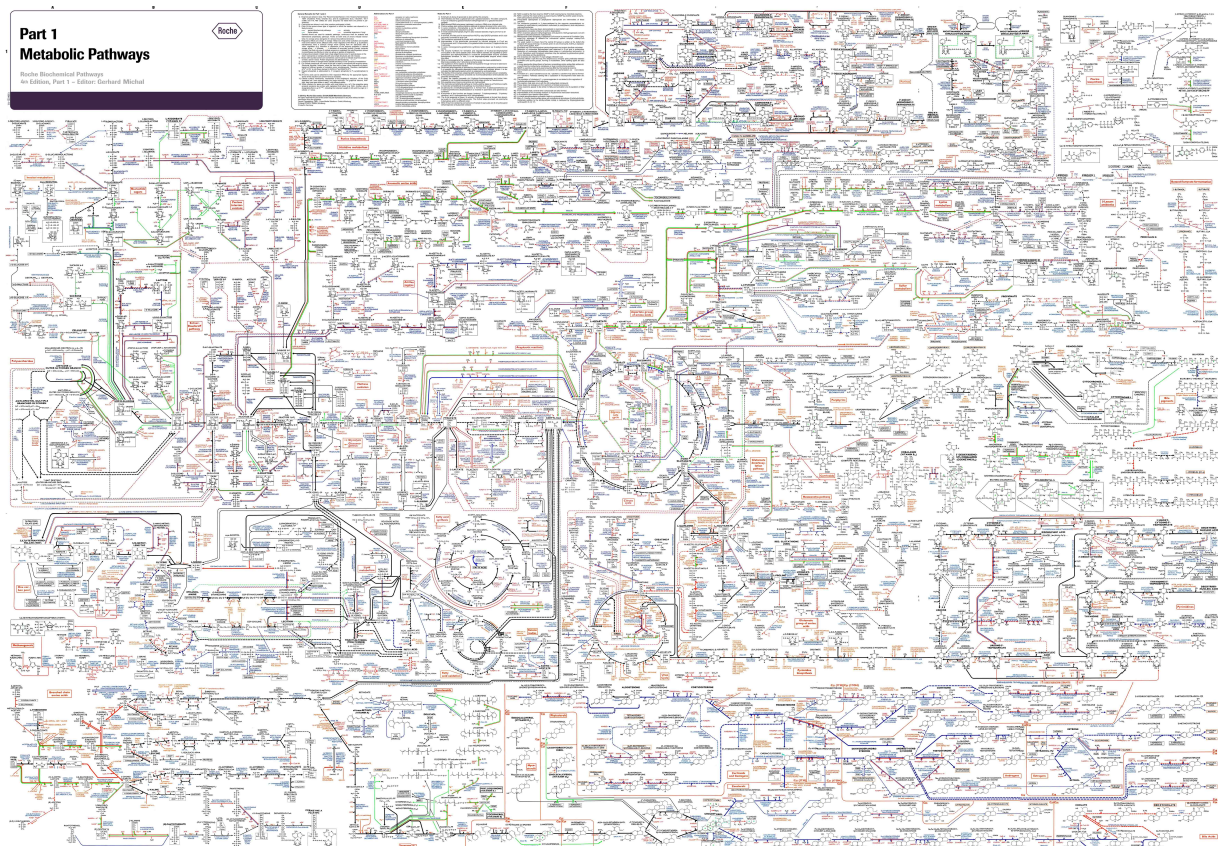
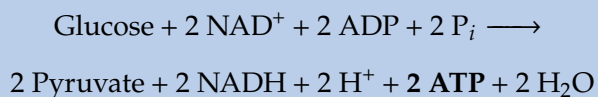


FIGURE 1.3 – Carte du métabolisme. Crédit : Roche Biochemical Pathways

1.1.1 Voies de production d'énergie

Parmi les voies métaboliques, il en existe deux principales qui servent à produire de l'énergie sous forme d'ATP. La première, la glycolyse, permet de transformer le glucose (source principale d'énergie pour la cellule) qui est transporté à l'intérieur des cellules en deux molécules de pyruvate au cours d'une séquence de dix réactions (figure 1.4) dont le bilan global est le suivant :

Bilan de la glycolyse



La glycolyse permet donc de produire deux molécules d'ATP à partir d'une molécule de glucose. Le pyruvate produit, peut être alors réduit en lactate via la lactate déshydrogénase (LDH) mais cette réaction ne produira pas plus d'ATP. Cet enchainement glycolyse - transformation en lactate est couramment appelé métabolisme anaérobie car les réactions ne font pas intervenir l'oxygène. Le lactate est alors excrété hors de la cellule, par les transporteurs

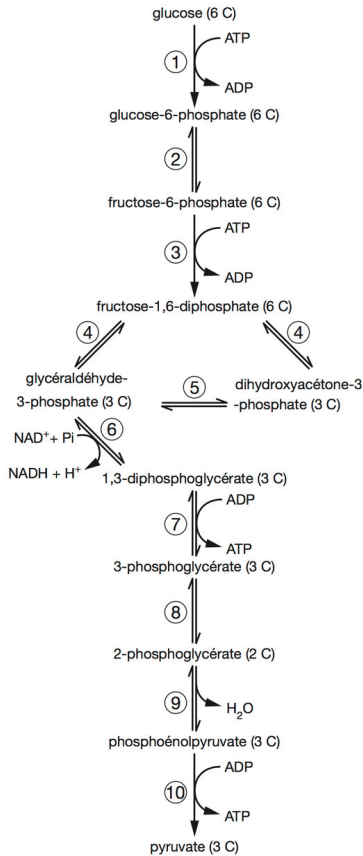


FIGURE 1.4 – Les dix réactions de la glycolyse

monocarboxylate (MCT).

A contrario, lorsque le pyruvate est décarboxylé en Acétyl-CoA par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) et entre dans la mitochondrie, on parle alors de métabolisme aérobie. Dans la mitochondrie il intervient dans le cycle de Krebs (figure 1.6), génère une molécule de GTP (équivalent énergétique à une molécule d’ATP) et génère du NADH et FADH₂. Ces dernières sont ensuite utilisées dans des réactions d’oxydation-réduction au sein de la chaîne respiratoire située dans la membrane mitochondriale interne. Les couples rédox NAD⁺/NADH et FAD/FADH₂ libèrent de l’énergie qui permet de pomper des protons et créer un gradient électrochimique au sein de l’espace intermembranaire de la mitochondrie. Ce potentiel énergétique s’accumule jusqu’à fournir suffisamment d’énergie à l’ATP synthase pour transformer l’ADP en ATP. C’est la dernière étape du processus appelé la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et elle utilise l’oxygène comme accepteur d’électrons (figure 1.5).

Bilan de l’OXPHOS

$$5 \text{ NADH} + \text{FADH}_2 + 17 \text{ ADP} + 17 \text{ P}_i + 3 \text{ O}_2 + 5 \text{ H}^+ \longrightarrow 5 \text{ NAD}^+ + \text{FAD} + 6 \text{ H}_2\text{O} + 17 \text{ ATP}$$

[17]: RICH (2003), « The molecular machinery of Keilin’s respiratory chain »

[18]: HINKLE (2005), « P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphory-

À partir d’une molécule de glucose, une cellule peut donc obtenir un maximum théorique de 38 molécules d’ATP. Cependant, les estimations expérimentales montrent que ce chiffre est moins important en réalité (entre 30 et 36) [17, 18]. Cela est en partie dû à la diffusion passive des protons à travers la membrane mitochondriale dissipant ainsi le gradient électrochimique faisant fonctionner l’ATP synthase.

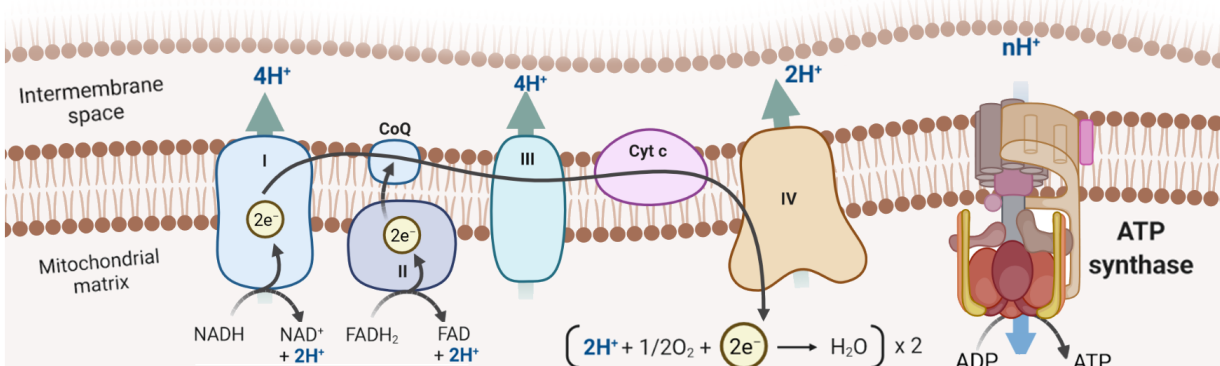


FIGURE 1.5 – La phosphorylation oxydative

De manière générale les composants issus de l'alimentation tels que les glucides, lipides ou encore les protéines peuvent contribuer à la production d'énergie en entrant dans ces voies métaboliques par différents points d'entrée. Les triglycérides sont dégradés en glycérol et en acide-gras. Le glycérol peut être utilisé pour reformer du glucose et la β -oxydation dégrade les acides-gras et génère du NADH et FADH₂ ainsi que de l'acétyl-CoA utilisés dans le cycle de Krebs et dans la chaîne respiratoire. En fonction de l'acide gras dégradé, d'importantes quantités d'ATP peuvent être produites (106 ATP pour l'acide palmitique). Ce qui est bien plus important que par la dégradation d'une molécule de glucose. La β -oxydation a cependant un ratio NADH/FADH₂ plus faible que l'oxydation du glucose ce qui entraîne également une plus importante consommation d'oxygène [19]. De plus le processus est plus lent que la glycolyse. Cela pourrait expliquer le fait que certains tissus dont le cerveau n'utilisent que très peu cette source d'énergie [20].

Les glucides (généralement stockés sous formes de longs polymères), sont utilisés pendant la glycolyse. Les polymères d'oses (osides) sont au préalable cassés en molécules plus simples (proche du glucose ou fructose). Par exemple le glycogène est transformé dans le foie en glucose-6-phosphate pour régénérer le taux de glucose dans le sang si celui-ci décroît. Les protéines sont quant à elles, d'abord décomposées en acides-aminés et utilisées si besoin, pour régénérer les métabolites intervenant dans, ou en amont du cycle de Krebs. L'acétyl-CoA peut par exemple être produit à partir de l'isoleucine.

1.1.2 Délimitations des voies métaboliques et réseaux

Comme dit en introduction de ce chapitre la caractérisation des voies métaboliques est un découpage. Les milliers de réactions constituant le métabolisme cellulaire forment un réseau dont la complexité peut être étudiée par des approches comme la théorie des graphes [21, 22]. Les voies métaboliques sont alors des sous-réseaux (ou sous-graphes) du réseau complet (figure 1.7). La problématique est de définir la meilleure manière de délimiter ces sous-graphes et de justifier leur existence. Historiquement, ce découpage s'est constitué par l'ordre dans lequel les réactions du réseau ont été découvertes (*ex* : glycolyse = le glucose transformé en X composés pour produire finalement du pyruvate). Ensuite on a établi un découpage fonctionnel (*ex* : glycolyse = réactions permettant la production d'ATP à partir de glucose jusqu'au pyruvate). On pourrait déjà déceler une forme d'arbitraire dans cette délimitation, "Pourquoi s'arrêter au pyruvate?", "Le glucose est-il la seule source glucidique?". On peut alors s'appuyer sur d'autres arguments

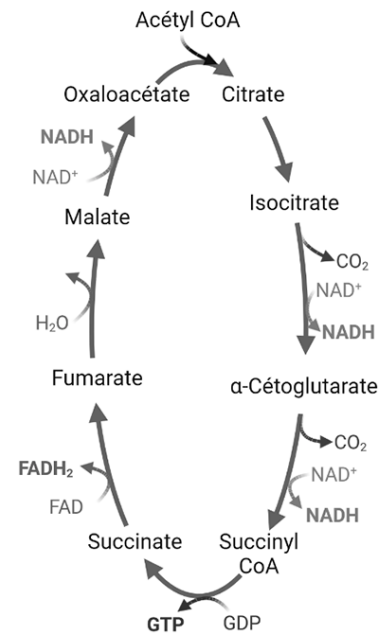


FIGURE 1.6 – Les réactions du cycle de Krebs

[19]: LEVERVE et al. (2007), « Choosing the right substrate. »

[20]: SCHÖNFELD et al. (2013), « Why does Brain Metabolism not Favor Burning of Fatty Acids to Provide Energy? - Reflections on Disadvantages of the Use of Free Fatty Acids as Fuel for Brain »

[21]: ZHOU et al. (2011), « Properties of metabolic graphs : biological organization or representation artifacts? »

[22]: BEGUERISSE-DÍAZ et al. (2018), « Flux-dependent graphs for metabolic networks »

[23]: LARHLIMI et al. (2011), « Robustness of metabolic networks : A review of existing definitions »

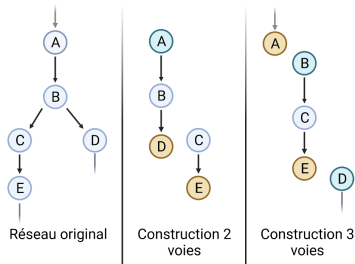


FIGURE 1.7 – Exemples de configurations de voies métaboliques à partir d'un réseau à 5 métabolites.

[24]: CASPI et al. (2013), « The challenge of constructing, classifying, and representing metabolic pathways »

[25]: JOSE et al. (2011), « Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation : A tumor's dilemma ? »

[26]: ZHENG (2012), « Energy metabolism of cancer : Glycolysis versus oxidative phosphorylation (review) »

[27]: BASU et al. (2020), « Metabolic switch from glycolysis to oxidative phosphorylation (ox-phos) provides survival advantage to anti-androgen-treated prostate cancer cells and make them vulnerable to mitochondrial metabolism inhibitors IACS-010759 and CB-839 »

[28]: OSTROUKHOVA et al. (2010), « Switching of Glucose Metabolism from Oxidative Phosphorylation to Aerobic Glycolysis (the Warburg Effect) in T-Cells from Patients with Asthma »

Note 1

Exemple : "Shooting between glycolysis and oxidative phosphorylation [...]", "Glycolysis versus oxidative phosphorylation [...]", "Metabolic switch from glycolysis to oxidative phosphorylation [...]".

notamment la structuration évolutive du métabolisme. Ce bloc qu'est la glycolyse est-il conservé parmi les espèces ? Depuis combien de temps ? Sont-ce les mêmes intervenants moléculaires ? Une autre manière de faire utilisant la théorie des graphes est d'étudier la robustesse du sous-graphe et la conservation de ses fonctions malgré son altération [23].

Il est alors bon de s'accorder au sein de la communauté scientifique sur la définition de telle ou telle voie métabolique ce qui induit des simplifications arbitraires (au regard de la réalité biologique). C'est le problème auquel sont confrontés les curateurs des bases de données du métabolisme [24]. Comment établir un consensus vis-à-vis des publications, des nouvelles découvertes et des définitions établies par les autres bases de données ?

Le risque qu'amène parfois ce découpage c'est de restreindre un métabolite à la fonction de la voie métabolique à laquelle il est attribué. Ce faisant on occulte son implication dans d'autres réactions. Un autre risque c'est d'opposer des voies métaboliques entre elles en se focalisant sur leurs fonctions plus que sur la topologie du réseau entier. Cela s'illustre bien avec les voies énergétiques aérobie et anaérobie décrites ci-dessus (et c'est l'objet de l'existence de ce paragraphe). De nombreux auteurs [25-28] opposent ces deux voies ¹ et bien que l'objectif soit de comparer les flux cela crée une dichotomie qui ferait penser que l'utilisation de l'une des deux voies, exclut celle de l'autre. Si l'on regarde la topologie du réseau métabolique décrit dans la section précédente ce n'est pas le cas. Cette dichotomie fréquemment employée dans la littérature associée au cancer sera analysée au chapitre 2.

1.2 Singularité tumorale

Le cancer (*grec ancien* *καρκινος*, *karkinos* (« écrevisse ») - *latin* *cancer* signifiant "crabe"), est une maladie qui implique la multiplication anormale de cellules formant parfois une masse et ayant une propulsion forte à se répandre à d'autres parties du corps. Lorsque cela arrive, les cellules cancéreuses affluent dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques, on parle alors de métastases. L'étymologie du mot provient d'Hippocrate qui compare la forme du cancer et ses ramifications aux pattes d'un crabe. Une tumeur correspond à l'augmentation anormale d'un volume tissulaire et bien que la plupart du temps employée pour désigner une masse cancéreuse, une tumeur n'est pas nécessairement cancéreuse (tumeur bénigne). Cependant, dans ce manuscrit, le terme de tumeur désignera les tumeurs malignes cancéreuses.

1.2.1 Caractéristiques générales des cancers

Il est difficile de définir "le" cancer car les propriétés qui le définissent sont nombreuses et varient d'un cancer à un autre. Cependant, on identifie parmi "les" cancers des caractéristiques communes qui permettent d'appréhender de manière plus détaillée la complexité de cette maladie. L'article de référence listant ces caractéristiques est celui de Douglas Hanahan et Robert Weinberg "The Hallmarks of Cancer" [29, 30], publié en 2000 et mis à jour en 2011. Il est difficile de ne pas en parler tant celui-ci a été cité, repris et réinterprété dans de nombreuses publications depuis sa publication. Les auteurs définissent dix grands axes qui se veulent universellement présents dans tous les cancers (mais d'intensité variable).

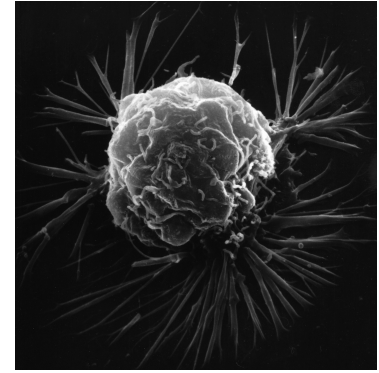


FIGURE 1.8 – Cellule du cancer du sein photographié par microscopie électronique. Crédit : Bruce Wetzler and Harry Schaefer - National Cancer Institute

Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération : Pour croître les cellules ont besoin de signaux (de prolifération - protéines ou hormones) qui leur indiquent qu'il leur est possible de se diviser. Ils sont très utiles car sans ces signaux il serait impossible pour des organismes multicellulaires d'assurer leur intégrité structurelle. Les cellules cancéreuses échappent à cette restriction et prolifèrent sans signaux externes. La page Wikipédia de l'article [31] donne des analogies que je trouve particulièrement parlantes : "La pédale de l'accélérateur est bloquée".

Insensibilité aux signaux anti-croissance : Lorsqu'une cellule est endommagée (notamment au niveau de son ADN), les gènes suppresseurs de tumeurs empêchent les cellules, au niveau de leur cycle, de se diviser. Le matériel génétique peut alors être réparé ou, si ce n'est pas possible, la cellule détruite par apoptose. De la même manière lorsque des cellules se retrouvent à l'étroit dans un environnement fermé, leur prolifération est stoppée (inhibition de contact) afin de ne pas amplifier le stress mécanique qu'elles subissent. Ces signaux d'anti-croissance sont ignorés par les cellules cancéreuses ou leur efficacité est fortement altérée (analogie [31] : Les freins ne fonctionnent pas).

Évasion de la mort cellulaire programmée : Ce point rejoint le précédent. Les cellules tumorales perdent leur capacité à mourir par apoptose. Ce processus permet normalement à une cellule dans diverses circonstances (comprenant les dommages cellulaires) d'initier une séquence de processus bien définis menant à sa mort pour garantir l'intégrité du tissu, son développement ou son renouvellement. Les mécanismes de détection d'anomalies peuvent être compromis et les gènes contrôlant le processus apoptotique, mutés, les rendant inopérants.

Potentiel de réplication illimité : Les chromosomes ont ce qu'on

[29]: HANAHAN et al. (2000), « The Hallmarks of Cancer »

[30]: HANAHAN et al. (2011), « Hallmarks of cancer : The next generation »

[31]: WIKIPEDIA (2022), *The Hallmarks of Cancer* — Wikipedia, The Free Encyclopedia

[32]: MEIMON (2014), *Culture de cellules animales*

[33]: GREENBERG (2005), « Telomeres, crisis and cancer. »

[34]: STÉPHANOU et al. (2017), « How tumour-induced vascular changes alter angiogenesis : Insights from a computational model »

[35]: PETER et al. (2015), « The role of CD95 and CD95 ligand in cancer »

[36]: HUBER et al. (2017), « Cancer acidity : An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation »

[37]: SINGH et al. (2019), « Inflammation and cancer »

pourrait appeler "un compteur" de division caractérisé par le raccourcissement de leurs télomères (extrémités) à chaque division. Lorsque les télomères sont trop courts la cellule devient sénescence et ne peut plus se diviser jusqu'à sa mort. Ce processus évite l'accumulation de mutations chez les descendants et serait un mécanisme évolutif privilégiant le maintien des cellules dans cet état plutôt que de miser sur leur réparation moins efficace avec l'âge [32]. Le cancer quant à lui triche, ses télomérases sont modifiées pour allonger les télomères et assurer une réplication illimitée [33].

Angiogenèse persistante : La tumeur prenant du volume, les cellules étant de plus en plus comprimées, elles ont de moins en moins accès aux nutriments et à l'oxygène apportés par les vaisseaux sanguins. Elle suscite donc au cours de sa croissance et par cycle [34], la production de nouveaux vaisseaux sanguins (sécrétion de facteurs d'angiogenèse).

Invasion des tissus et métastases : Les tumeurs peuvent dans certains cas envahir les tissus voisins ou disséminer des cellules tumorales dans d'autres parties du corps via les vaisseaux. Cela suppose une capacité d'adaptation à des conditions changeantes et différentes du tissu originel sous-tendant une flexibilité génétique et métabolique.

Évasion du système immunitaire : Les cellules tumorales disposent de multiples outils moléculaires les conduisant à échapper à la réponse immunitaire de l'organisme. Le fait d'éviter l'apoptose élimine déjà les réponses immunitaires qui enclenchent ce processus. Elles peuvent à l'inverse induire l'apoptose des lymphocytes T en exprimant des protéines de surface FasL [35]. Le pH, très acide dans l'environnement autour de la tumeur fonctionne comme une barrière, empêchant les cellules immunitaires d'accéder aux cellules tumorales ou les rend inopérantes [36].

Inflammation : Le système immunitaire qui est fortement mobilisé pour contrer la progression tumorale pourrait également la favoriser. En créant un environnement inflammatoire autour de la tumeur, le système immunitaire dégrade la matrice extracellulaire et les cellules saines adjacentes et pourrait se faisant renforcer l'accès de la tumeur au réseau vasculaire et accroître sa dissémination. Quelle que soit l'origine de cette inflammation, si elle devient chronique les répercussions qui en découlent sont les mêmes. Il est ainsi probable que de nombreuses agressions externes (infections bactériennes ou virales notamment) ou des facteurs plus exogènes (tabac, alcool, obésité, expositions aux pesticides, etc.) [37] provoquent et/ou facilitent l'installation d'un environnement propice à la prolifération tumorale.

Instabilité génétique : Les cellules tumorales subissent de nom-

breuses mutations qui modifient la manière dont l'ensemble des individus cellulaires locaux se comportent. Cela crée une très forte hétérogénéité aussi bien au sein d'une même tumeur qu'entre des tumeurs différentes (du même organisme ou non). Ces mutations très fréquentes permettent de parler d'écologie tumorale. Les processus en jeu sont soumis aux lois de l'évolution (en particulier à la sélection naturelle). Ce point sera traité au chapitre 2 Section 2.3.

Métabolisme dérégulé : De la même manière que le génome est très hétérogène au sein de la population tumorale, le métabolisme l'est aussi. Les cellules subissent une forte pression environnementale et des modifications génétiques les poussant à fonctionner dans des modes métaboliques différents (dans leur nature ou simplement dans la répartition des flux de production de métabolites) de celui du tissu d'origine.

1.2.2 Mutations génétiques

Il ne serait pas exagéré de dire que chaque cellule cancéreuse a un profil génétique unique ce qui entraîne une très grande hétérogénéité au sein du tissu. On constate cependant une prévalence de certaines mutations qui se retrouvent fréquemment au sein d'un même tissu (intra-individu) mais également entre cancers chez des individus différents (inter-individu).

Le plus connu des gènes mutés des cancers est sans conteste le gène TP53 [38]. Au sein de la population des États-Unis, celui-ci est muté chez 35% des patients (fréquence sur l'ensemble des cancers) [39]. Ce gène est une sorte de garde-fou cellulaire qui en situation de stress, active la transcription d'une multitude de gènes visant à arrêter le cycle cellulaire et réparer d'éventuelles lésions de l'ADN ou, si ce n'est pas possible d'enclencher l'apoptose [40, 41]. On imagine alors aisément l'impact qu'aurait la mutation d'un tel gène sur l'apparition ou la progression d'une tumeur. On retrouve ensuite PIK3CA (un oncogène) et LRP1B (un gène codant pour un récepteur à LDL) mutés dans environ 15% des cas. Les 47 autres gènes les plus mutés dans la population américaine, sont indépendamment présents dans moins de 10% des cas (tous cancers confondus) globalement aux alentours de 5% [39]. En fait, la distribution de chacun de ces gènes au sein de types de cancers différents est très hétérogène. Le gène TP53 est fréquemment muté dans les cancers ovariens (47.8%), colorectaux (43.2%) ou œsophagien (43.1%) et finalement assez peu dans les leucémies primaires, sarcomes, cancers testiculaires ou mélanomes (5%) [42].

Il peut en découler deux réflexions : on peut se demander pourquoi ces valeurs sont si peu élevées dans l'absolu. Ne pourrait-on pas

[38]: ZHU et al. (2020), « Mutant p53 in Cancer Progression and Targeted Therapies »

[39]: MENDIRATTA et al. (2021), « Cancer gene mutation frequencies for the U.S. population. »

[40]: CHEN (2016), « The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression »

[41]: FEROS et al. (2020), « Exploring the multiple roles of guardian of the genome : P53 »

[42]: OLIVIER et al. (2009), « TP53 Mutations in Human Cancers : Origins, Consequences, and Clinical Use »

[43]: GERSTUNG et al. (2020), « The evolutionary history of 2,658 cancers »

trouver un gène muté dans 95% des cas pour tous les cancers? Cela permettrait de décrire facilement une origine génétique du cancer. Ce n'est absolument pas le cas et les nombreuses données de séquençage montrent que bien qu'il semble il y avoir des gènes mutés plus précocement que les autres, il n'y a pas une "unique" origine génétique commune pour tous les cancers (du moins pour l'instant rien ne vas dans ce sens) [43]. Chaque cancer a subi des mutations qui viennent perturber, rendre instable, un réseau génétique. Dans ce cas, vient la seconde réflexion totalement à l'opposée de la première : pourquoi les fréquences de mutations de certains de ces gènes sont si élevées? En effet, si l'on considère que les mutations génétiques surviennent de manière aléatoire, pourquoi retrouver plus certains gènes que d'autres et pourquoi dans de telles proportions?

Il y a plusieurs éléments de réponse ; le premier statistique, parmi toutes les mutations survenant sans cesse chez les organismes vivants, les mutations susceptibles de désactiver les mécanismes de réparations de l'ADN ont plus de chances d'être observés. Ensuite l'importance (relative) de chaque gène et sa contribution au sein d'une cellule peut dépendre de sa localisation dans l'organisme. Une mutation n'a alors pas une influence fixée et absolue mais bien dépendante du contexte cellulaire. Là encore on n'observerait que les mutations et leurs contextes, ayant induit l'apparition d'une tumeur. Ensuite, les mutations tumorales ne sont probablement pas un processus strictement aléatoire.

[44]: KREWSKI et al. (2019), « Key characteristics of 86 agents known to cause cancer in humans »

Note 2

Il suffit de rechercher sur internet "risque cancer" et n'importe quel [nom d'aliment] pour avoir une chance de tomber sur un article ou une étude qui indique que l'aliment en question favorise le risque de cancer. J'ai par exemple essayé avec les cacahuètes et il semble que cela aggrave le risque de métastases.

[45]: JACOB et al. (2018), « Impact of tobacco smoking on the risk of developing 25 different cancers in the UK : a retrospective study of 422,010 patients followed for up to 30 years »

[46]: POSCHL (2004), « Alcohol and Cancer »

[47]: CANNATARO et al. (2022), « Attribution of Cancer Origins to Endogenous, Exogenous, and Preventable Mutational Processes »

[48]: EWALD et al. (2012), « Infection, mutation, and cancer evolution »

Depuis des années le public est familiarisé avec les longues listes de produits, substances, nourritures, hygiène de vie favorisant l'émergence de cancers [44]. Bien que souvent la plupart des éléments décrits dans les journaux sont plus anxiogènes que réellement dangereux², il est inconcevable de nier la relation entre la cigarette et le cancer du poumon [45] ou encore entre la consommation abusive d'alcool et le cancer buccal et du pharynx [46]. Ainsi certains composés exogènes peuvent avoir des actions ciblées sur l'ADN augmentant la fréquence de leurs mutations [47]. Un autre élément très important et mis en lumière depuis quelques années est l'origine infectieuse de beaucoup de cancers. On peut citer par exemple le virus d'*Epstein-Barr* à l'origine du lymphome de Burkitt ou du cancer du nasopharynx, le papillomavirus provoquant le cancer du col de l'utérus ou le virus de l'hépatite B impliqué dans le cancer du foie [48]. Le papillomavirus par exemple exprime une protéine *E6* qui cible TP53 pour initier sa dégradation et une protéine *E7* qui interrompt l'arrêt du cycle cellulaire [48].

Tous ces éléments permettent de considérer l'hétérogénéité génétique du cancer n'ont pas seulement vis-à-vis de l'expression génétique elle-même mais aussi au regard de la variété des mécanismes initiateurs des dérégulations. L'approche théorique prédo-

minante actuelle au sein de la communauté scientifique vis-à-vis de l'émergence du cancer est que le cancer est une maladie d'origine génétique. Il est d'ailleurs intéressant de citer l'extrait traduit de la conclusion de Hanahan et Weinberg en 2000 dans "The Hallmarks of Cancer" dont il a été question plus haut [29]³ :

"Dans deux décennies, après avoir entièrement tracé les schémas des connexions entre chaque voie de signalisation cellulaire, il sera possible de représenter le "circuit intégré de la cellule" complet par dessus celui que l'on discerne actuellement. Nous pourrions alors appliquer les outils de modélisation mathématique pour expliquer comment des lésions génétiques spécifiques servent à reprogrammer ce circuit intégré dans chacun des types cellulaires constitutifs afin de manifester un cancer."

Vingt ans plus tard, la recherche a effectivement affiné la carte des réseaux métaboliques et tenté de multiples approches de modélisation afin d'éprouver (entre autre) la robustesse de ces réseaux [23]. Cependant, lorsque l'on semble présenter l'émergence du cancer par "les lésions génétiques" qui le caractérise, on oublie d'expliquer pourquoi ces "lésions génétiques" surviennent. Est-ce au fond le ballon qui casse la vitre ou la personne qui tire dedans ? En lisant certaines publications on pourrait avoir l'impression que la cause de la vitre cassée (cancer) a été élucidée alors que seul le ballon (la mutation) a été trouvé.⁴ Après avoir observé qu'il n'y avait pas un mais *des* profils génétiques tumoraux et la nécessité d'une médecine personnalisée, la communauté scientifique a compris au cours de ces vingt ans, la nécessité d'adopter une vision intégrée de la cellule et de considérer les différentes échelles dans leur ensemble [49]. C'est ce que permet notamment les différentes approches *-omique* et multiomique qui élargissent les champs de recherche au transcriptome, protéome ou au métabolome [50]. De manière générale, il est difficile de comprendre le fonctionnement du cancer en ne regardant pas l'ensemble de la cellule, de son ADN jusqu'à son environnement immédiat.

1.2.3 Le métabolisme et l'effet Warburg

Otto Warburg, médecin et biochimiste allemand, prix Nobel de médecine en 1931, fit le constat au début des années 1920 que les cellules cancéreuses produisent beaucoup plus de lactate (fermentation) que des cellules saines. Ce qui rend l'observation particulière est, outre l'augmentation de la fermentation elle-même, le fait que celle-ci semble survenir également en présence d'oxygène. En temps normal, une cellule saine ayant de l'oxygène à disposition a

Note 3

Extrait original : "Two decades from now, having fully charted the wiring diagrams of every cellular signaling pathway, it will be possible to lay out the complete "integrated circuit of the cell" upon its current outline. We will then be able to apply the tools of mathematical modeling to explain how specific genetic lesions serve to reprogram this integrated circuit in each of the constituent cell types so as to manifest cancer."

Note 4

La métaphore a certes ses limites dans la mesure où on ne peut pas complètement écarter l'aléatoire stricte d'une mutation et il n'y a pas forcément toujours un élément initiateur.

[49]: HASIN et al. (2017), « Multi-omics approaches to disease »

[50]: SUBRAMANIAN et al. (2020), « Multi-omics Data Integration, Interpretation, and Its Application »

[51]: POTTER et al. (2016), « The Warburg effect : 80 years on »

[52]: WARBURG (1956), « On the Origin of Cancer Cells »

[51]: POTTER et al. (2016), « The Warburg effect : 80 years on »

[53]: SENYILMAZ et al. (2015), « Chicken or the egg : Warburg effect and mitochondrial dysfunction »

[54]: XIE et al. (2014), « Beyond Warburg effect - Dual metabolic nature of cancer cells »

[55]: FREZZA (2020), « Metabolism and cancer : the future is now »

[56]: ZHOU et al. (2010), « The metabolic switch and its regulation in cancer cells »

Note 5

"Metabolic switch", traduit par "interrupteur métabolique" en français, mais la traduction française n'étant que très peu utilisée, je privilégierai le terme "switch"

plutôt tendance à utiliser le pyruvate produit lors de la glycolyse dans la mitochondrie plutôt que de produire du lactate (voir le début de ce chapitre). En 1924, Warburg fit donc l'hypothèse qu'il devait exister un défaut au sein de la cellule cancéreuse l'empêchant d'utiliser correctement la mitochondrie pour produire de l'énergie en consommant du pyruvate et de l'oxygène [51]. En 1956 il exposa ses observations et détailla son hypothèse dans son article "*On the Origin of Cancer Cells*" [52]. Pour lui l'apparition des cellules cancéreuses était due à ce changement d'origine métabolique.

Depuis, l'hypothèse selon laquelle la mitochondrie serait déficiente entraînant une incapacité à utiliser l'oxygène a été partiellement invalidée [51]. Il peut advenir que dans certains cas des mutations empêchent les mitochondries de fonctionner normalement mais dans bien d'autres cas, la mitochondrie est parfaitement opérationnelle et pourtant l'effet subsiste [51, 53]. Il reste donc plusieurs mystères ; "*pourquoi les cancers fermentent-ils autant ?*", "*et pourquoi même en présence d'oxygène ?*", "*toutes les cellules du tissu tumoral fermentent-elles ?*", "*ont-elles toutes réellement accès à l'oxygène ?*", "*les mécanismes poussant les cellules à fermenter au sein d'un même tissu sont-ils tous les mêmes ?*".

Ces questions ont fait débattre la communauté scientifique depuis presque 100 ans maintenant et n'ont pas trouvé de réponses claires, seulement des éclaircissements. Au-delà des considérations purement techniques la question fondamentale à laquelle les chercheurs ont été confrontés est : "*Existe-t-il une signature métabolique qui distingue un phénotype sain et tumoral ?*". C'est ce que Warburg pensait. Avec l'apparition de la génomique moderne cette question s'est progressivement détournée vers la recherche d'une signature génomique [14]. Comme nous l'avons vu dans la section précédente, il n'existe pas de réelle signature génomique unique à l'heure actuelle. Ces vingt dernières années, le regain d'intérêt pour l'étude du métabolisme des cancers fait fleurir des milliers d'articles sur la question, réabordant les constats de Warburg et portant l'espoir de segmenter le métabolisme en un sain et un tumoral, de la même manière que cela a tenté d'être fait pour le génome. C'est avec cette question que j'ai commencé la présente thèse.

Pour répondre, il est donc intéressant de savoir si les caractéristiques métaboliques des cancers sont suffisantes pour les différencier d'un métabolisme sain. Depuis des années, de nombreux articles [54-56] ont souligné la double nature des cellules cancéreuses : le terme *switch* métabolique⁵ par exemple est utilisé pour désigner le passage d'un métabolisme basé sur la phosphorylation oxydative à la glycolyse. Ce switch est souvent employé pour désigner l'effet Warburg lui-même. Dans cette configuration une cellule saine utilise l'oxygène dans la mitochondrie et "switch" en mode

fermentation en devenant cancéreuse [57]. Il est intéressant de noter que lorsque le terme de switch métabolique est employé pour désigner l'effet Warburg il s'agit d'une erreur épistémologique. En effet, l'effet Warburg est le constat d'une surproduction de lactate et en aucun cas son explication. Le switch métabolique en réalité, est l'hypothèse qui décrit le changement de régime métabolique ce qui *de facto* fait émerger l'effet Warburg. Le terme de switch métabolique est devenu tellement répandu et populaire qu'il a, à mon sens, entraîné une déviation sémantique et conceptuelle de ce qu'est réellement l'effet Warburg. En mélangeant observation et hypothèse de travail, on ne cherche plus à savoir si ce switch existe réellement mais simplement à le caractériser. Ce point sera analysé plus en détail dans le chapitre 2.

Pourtant, certains auteurs ont souligné que l'utilisation de ce terme « *switch métabolique* » pourrait être inapproprié et remettent en question sa nature [58, 59]. En effet, il est désormais établi que les cellules cancéreuses utilisent simultanément les deux modes de production d'énergie, mais dans des proportions différentes [60]. L'observation que les cellules peuvent utiliser la fermentation en présence d'oxygène n'implique pas nécessairement que l'oxygène est toujours disponible ou que le glucose devient leur seul substrat. Pourtant l'idée principale exprimée par Warburg dans son article de 1956 [52] était bien celle de la surexpression de la fermentation avant de considérer ou non la présence d'oxygène. De plus, certaines lignées cellulaires montrent de fortes différences entre l'absorption du glucose et la sécrétion de lactate suggérant fortement un phénotype non Warburgien [58]. En fait, étiqueter le métabolisme du cancer comme glycolytique aérobie ou décrit par un simple interrupteur métabolique [60] cache de nombreux états métaboliques différents, la possibilité d'états transitoires et crée une dichotomie dans laquelle il n'y a que deux modes de fonctionnement exclusifs pour la cellule. La prévalence de certaines conditions au sein d'une cellule n'exclut pas l'existence d'autres qui, si elles existent, ne peuvent être simplement considérées comme des artefacts.

Une étude récente [54] a montré que sous acidose lactique (condition rencontrée dans la plupart des tumeurs solides), les cellules abandonnent progressivement le phénotype Warburgien pour revenir à un phénotype non glycolytique (taux élevé de consommation d'oxygène). En acidose lactique, le pH intracellulaire est plus bas, ce qui tend à inhiber l'activité de la plupart des enzymes glycolytiques. Les protons et le lactate, tous deux produits de la fermentation, sont eux-mêmes responsables de son altération. C'est une forme de rétro-inhibition de la glycolyse. Les auteurs [54] ont proposé que l'effet Warburg confère un avantage de croissance jusqu'à ce qu'il n'y ait pas assez de glucose ou d'acide lactique,

[57]: Yu et al. (2017), « The Glycolytic Switch in Tumors : How Many Players Are Involved ? »

[58]: DeBERARDINIS et al. (2020), « We need to talk about the Warburg effect »

[59]: MURPHY et al. (2020), « How should we talk about metabolism ? »

[60]: XIAO et al. (2019), « Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution »

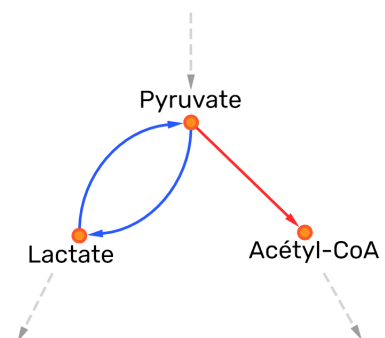


FIGURE 1.9 – Embranchement métabolique issu du pyruvate

[61]: [ALMUHAIDEB et al.](#) (2011), « F-FDG PET/CT Imaging In Oncology »

[62]: [FAUBERT et al.](#) (2020), « Metabolic reprogramming and cancer progression »

[63]: [YOSHIDA](#) (2015), « Metabolic reprogramming : the emerging concept and associated therapeutic strategies »

[64]: [DIENEL et al.](#) (2016), « Aerobic glycolysis during brain activation : adrenergic regulation and influence of norepinephrine on astrocytic metabolism »

[65]: [JONES et al.](#) (2015), « Aerobic glycolysis : Beyond proliferation »

[60]: [XIAO et al.](#) (2019), « Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution »

[62]: [FAUBERT et al.](#) (2020), « Metabolic reprogramming and cancer progression »

[66]: [PACHECO et al.](#) (2019), « Identifying and targeting cancer-specific metabolism with network-based drug target prediction »

[67]: [PERSI et al.](#) (2018), « Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy »

[68]: [DAMAGHI et al.](#) (2013), « pH sensing and regulation in cancer »

[69]: [WHITE et al.](#) (2017), « Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance »

[70]: [LUO et al.](#) (2018), « Highly Sensitive Hill-Type Small-Molecule pH Probe That Recognizes the Reversed pH Gradient of Cancer Cells »

[71]: [JIN et al.](#) (2020), « The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing »

alors les cellules doivent s'adapter au micro-environnement et utiliser d'autres substrats. De plus, le lactate extracellulaire est un substrat qui peut être réutilisé par la cellule, reconverti en pyruvate et utilisé dans le cycle de Krebs, un fait souvent écarté (voir figure 1.9). Ainsi, l'effet Warburg n'est pas toujours observé dans chaque cellule cancéreuse d'une tumeur donnée [58]. Dans ces conditions, il ne peut pas être considéré comme un marqueur métabolique universel / ubiquitaire des cellules cancéreuses. Il peut cependant représenter un bon marqueur à l'échelle tissulaire. De multiples techniques utilisent le métabolisme pour cibler les cellules et tissus cancéreux. Le scanner FDG-PET (tomographie par émission de positons de fluorodésoxyglucose) est particulièrement utilisé pour le diagnostic du cancer [61] grâce à la détection de zones d'absorption élevée de glucose. Mais cette identification par l'utilisation seule d'analogues radios-pharmaceutiques du glucose n'assure pas la détection parfaite de toutes les cellules cancéreuses dans tous les types de cancer [62, 63].

De plus, l'orientation métabolique des cellules vers l'utilisation de la glycolyse aérobie n'est pas spécifique du cancer. La glycolyse aérobie peut être fréquemment rencontrée lors de l'activation cérébrale [64], la germination des vaisseaux ou dans les processus de mémoire immunitaire [65].

Plusieurs études ont montré que l'hétérogénéité métabolique au sein des cellules tumorales d'un même tissu était un obstacle à l'identification d'un profil métabolique commun à toutes ces cellules [60, 62]. De plus, le profil global / massif de ces tissus reste similaire à celui de leur version saine [66]. S'il était possible de prédire la tumorigénicité d'une cellule par son seul métabolisme, cela se ferait probablement en considérant plusieurs facteurs convergents plutôt qu'un seul. Trouver une cible universelle pour le métabolisme du cancer serait un énorme pas en avant dans la recherche d'une solution thérapeutique. Mais pour l'instant, cette cible universelle du métabolisme, si elle existe, n'est pas encore connue bien qu'il puisse y avoir des pistes prometteuses telles que le gradient de pH intra / extracellulaire inversé [67-71].

Ces réflexions ont fait émerger une nouvelle question comme ligne directrice pour la suite de mes travaux. "Comment l'hétérogénéité métabolique tumorale peut-elle émerger?". De cette question découle de nombreuses problématiques que j'essaierai d'adresser au cours des prochains chapitres : "L'hétérogénéité métabolique a-t-elle besoin d'avoir une origine génétique (mutations) pour exister?" ; "L'hétérogénéité est-elle spatiale, temporelle, les deux?" ; "Cette hétérogénéité est-elle bénéfique pour la population tumorale?".

1.3 Paysage métabolique

Pour considérer l'hétérogénéité métabolique il est essentiel de considérer l'hétérogénéité de l'environnement. Le microenvironnement dans lequel baignent les cellules offre les substrats qui constituent les points d'entrées et de sorties des réactions. L'hétérogénéité environnementale est responsable de nombreuses transitions métaboliques (l'acidose lactique en est un exemple, mais également l'hypoxie ou la privation de nutriments sont souvent rencontrées dans la partie la plus centrale des tumeurs - le cœur nécrotique). De nombreux modèles théoriques et expérimentaux tentent d'aborder la complexité du métabolisme du cancer, mais font face à la difficulté de saisir l'énorme hétérogénéité des cellules et des conditions micro-environnementales. Or, il est important d'être prudent sur les conclusions tirées de modèles basés sur une population cellulaire trop homogène et sur des mesures globales à l'échelle tissulaire [72].

Les avancées technologiques dans la mesure des paramètres métaboliques au niveau cellulaire ont permis l'identification de comportements très hétérogènes [60] en fonction de l'emplacement des cellules dans le même tissu et a révélé des dynamiques assez subtiles qui n'apparaissent pas à l'échelle du tissu entier [73]. Cela a été confirmé dans une étude [60] sur deux lignées cellulaires (mélanome et HNSCC) où les profils ARN *single-cells* (cellule par cellule) et *bulk* (pris dans l'ensemble du tissu) ont été comparés et ont montré de grandes différences. En fait, les mesures tissulaires ont tendance à masquer les différences entre cellules en moyennant les niveaux d'expression. Dans cette étude, la variation de l'activité de phosphorylation oxydative (OXPHOS) est le principal contributeur à l'hétérogénéité métabolique dans les cellules malignes et saines et sert de capteur de disponibilité d'oxygène tout en stabilisant les facteurs induits par l'hypoxie (HIF). L'hétérogénéité tumorale comprend également des mécanismes de coopération supposée / apparente entre les cellules tumorales et les cellules stromales (CAF) [74], certaines cellules produisant du lactate par fermentation, lactate capturé et utilisé par d'autres cellules dans différentes conditions extracellulaires. Ce processus fut nommé « effet Warburg inverse » ou « couplage métabolique à deux compartiments ». L'hétérogénéité temporelle est également importante. Les cellules sont soumises à des variations d'oxygénation dues à l'angiogenèse. Elles surviennent sous forme de cycles, suite à la maturation vasculaire [75, 76]. On est bien loin de la vision binaire d'un switch entre deux métabolismes bien définis.

La quantification des contributions respectives sur le métabolisme, des facteurs génétiques-épigénétiques d'une part et des facteurs

[72]: STRICKAERT et al. (2017), « Cancer heterogeneity is not compatible with one unique cancer cell metabolic map »

[73]: DAMIANI et al. (2019), « Integration of single-cell RNA-seq data into population models to characterize cancer metabolism »

[74]: SONVEAUX et al. (2008), « Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice »

[75]: DEWHIRST et al. (2008), « Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response »

[76]: DEWHIRST (2009), « Relationships between Cycling Hypoxia, HIF-1, Angiogenesis and Oxidative Stress »

biophysiques imposés par l'environnement d'autre part, est techniquement très difficile à obtenir. Cette difficulté technique vient du manque de données accessibles mais également du manque d'études où ces deux paramètres seraient mesurés simultanément. Il est tout à fait possible d'imaginer que leurs proportions varient fortement entre les tissus d'où proviennent les tumeurs et d'une personne à l'autre.

1.3.1 États transitoires, états stationnaires et états d'équilibres

Lorsque l'on observe une cellule on est limité dans les observations que l'on fait, par la résolution de ces observations. Si les concentrations de pyruvate au sein d'une cellule ne varient pas, il faut être en mesure de 1) prouver qu'il n'y a effectivement pas de variation, 2) définir si cette absence de variation correspond à un état stationnaire ou d'équilibre. Le premier point est directement associé à notre capacité d'observation. Pour caractériser un état on est contraint de faire au moins deux observations dans le temps pour définir une dynamique (dérivée), une variation, connaître la précision des outils qui mesurent cette variation et préciser si cette variation si elle est mesurée, est significative ou non. Concernant le deuxième point, il faut définir si cet état est durable dans le temps, à l'échelle cellulaire, tissulaire ou absolue. Si on connaît suffisamment les éléments qui constituent le système, on peut le déduire sans avoir besoin de perpétuer l'observation pendant un temps infini. Si une baignoire se vide à vitesse constante et est remplie en même temps et à la même vitesse par un réservoir d'eau, il n'est pas nécessaire d'attendre la fin de l'écoulement du réservoir pour savoir qu'à terme la baignoire ne pourra pas conserver un volume constant d'eau. Cependant, si l'on ne sait pas que la baignoire est maintenue à volume constant d'eau par un réservoir, quel doit être le temps caractéristique d'observation qui doit être pris afin de définir l'état de la baignoire ?

Lorsque l'on a un équilibre dynamique comme pour la baignoire on parle d'état stationnaire, car l'apparente invariance du volume d'eau résulte d'un flux entrant et sortant égal. La cellule comme dans cet exemple est un système ouvert dont les réactions observables sont bien souvent dans des états quasi stationnaires et dépendent des concentrations à l'extérieur pour le maintien des concentrations à l'intérieur. L'état d'équilibre thermodynamique n'existe pas en tant que tel dans la cellule si l'on regarde l'ensemble complet de ses réactions [77]. Définir un état stationnaire (équilibre dynamique) n'est faisable qu'en précisant un référentiel temporel (observé) et structurel (réactions, compartiments cellulaires, tissus, environnement). Dans l'exemple de la baignoire, l'état stationnaire

[77]: WOLFE (2015), *Cellular Thermodynamics : The Molecular and Macroscopic Views*

est défini pendant un temps donné (le temps de vidage du réservoir) et seulement au niveau de la baignoire. Si le référentiel est maintenant défini comme étant l'ensemble réservoir-baignoire l'état stationnaire n'existe plus. Ces aspects sont importants pour comprendre ce qu'est l'hétérogénéité d'un tissu au regard des cellules elles-mêmes ainsi que de leur microenvironnement. En considérant momentanément une invariabilité imaginaire du métabolisme d'une cellule, de ses concentrations maintenues constantes, le microenvironnement dans lequel elle baigne, est lui chargé de l'historique de la cellule. Le seul moyen de retrouver un microenvironnement stable, dans un état stationnaire c'est d'élargir encore plus le système, en considérant les échanges entre le microenvironnement et le reste de l'organisme (typiquement via les vaisseaux sanguins). Cependant, que se passe-t-il si on en vient à considérer l'ensemble microenvironnement-cellules comme un système quasi fermé? La densité de cellules, l'acidité ambiante, la vascularisation chaotique du tissu sont des éléments qui dans le cadre du cancer créent un microenvironnement qui peine à se renouveler et à se maintenir dans un état stationnaire. Il devient donc important de considérer la dynamique de l'environnement comme une extension directe du métabolisme des cellules et comme élément constitutif du système.

Revenons sur l'exemple de l'effet Warburg. L'observation "les cellules tumorales produisent énormément de lactate par rapport aux cellules saines" trop souvent perçue de manière absolue, pourrait faire penser qu'on parle là d'un état stationnaire des cellules. Est-ce bien le cas? En regardant les conditions de cette affirmation on nuance : "à condition qu'il y ait suffisamment de glucose dans le milieu ou de pyruvate dans les cellules, s'il n'y a pas trop d'acide lactique dans le milieu [54] et si elles ne sont pas d'un type cellulaire d'avantage oxydatif". Il me semble qu'au vu de ces considérations le caractère universel (au sens qui est donné dans l'article "The Hallmarks of Cancer" [29]) n'est pas vraiment adapté à la cellule tumorale. Il semble plus approprié de définir l'effet Warburg comme une caractéristique macro-métabolique ou d'écologie tumorale. C'est la dynamique du tissu et son hétérogénéité qui fait émerger cette caractéristique maintenue dans le temps et non pas à l'échelle cellulaire. La cellule qui maintient un taux de production de lactate élevé, fait baisser le pH de son milieu extérieur et se faisant inhibe la glycolyse productrice de pyruvate, générateur de lactate. Si cette cellule ne revient pas à un métabolisme oxydatif quelle qu'en soit la raison (manque d'oxygène ambiant, mitochondrie défectueuse) elle est inévitablement vouée à la mort. Il n'y a pas là d'état durable.

La focalisation sur la question "pourquoi autant de lactate dans le cancer" bien que légitime ne doit pas faire oublier l'existence des autres états dans le tissu. L'erreur d'un point de vue théorique qui

pourrait être faite (à mon sens) est d'accorder plus d'importance à la temporalité et à la prévalence d'un phénotype métabolique plus qu'à son hétérogénéité. Un expérimentateur très chevronné qui observe une voiture pourrait conclure qu'à 99.9% une voiture fonctionne ses portières fermées. C'est son phénotype dominant. Pourtant, il existe quelques secondes, minutes, ramenées à la vie d'une voiture, pouvant échapper à l'observateur, pendant lesquelles les portières sont ouvertes et permettant à quelqu'un d'entrer dedans. Comment qualifier l'état "portière ouverte"? Est-ce un artefact? Cet état a-t-il moins d'importance que l'état "portière fermée"? C'est bien l'ouverture et la fermeture des portières qui à terme permet de mettre la voiture en mouvement. D'où l'importance d'énumérer les états. Il est justement difficile de le faire par l'expérimentation bien que souhaitable et c'est pourquoi l'utilisation de modèles numériques est un réel atout.

[78]: CASCIARI *et al.* (1992), « Mathematical modelling of microenvironment and growth in EMT6/Ro multicellular tumour spheroids »

[79]: DuBois *et al.* (2012), « A multiple time-scale computational model of a tumor and its micro environment »

[80]: PHIPPS *et al.* (2015), « A microscale mathematical model for metabolic symbiosis : Investigating the effects of metabolic inhibition on ATP turnover in tumors »

[81]: JAGIELLA *et al.* (2016), « Inferring Growth Control Mechanisms in Growing Multi-cellular Spheroids of NSCLC Cells from Spatial-Temporal Image Data »

[82]: SHAMSI *et al.* (2018), « Mathematical Modeling of the Function of Warburg Effect in Tumor Microenvironment »

[83]: POURHASANZADE *et al.* (2021), « A New Mathematical Model for Controlling Tumor Growth Based on Microenvironment Acidity and Oxygen Concentration »

[84]: LI *et al.* (2020), « Uncovering the Underlying Mechanisms of Cancer Metabolism through the Landscapes and Probability Flux Quantifications »

Plusieurs modèles ont exploré des états possibles du métabolisme tumoral vis-à-vis de l'environnement [78-83]. Un modèle récent [84] a cependant abordé la question par des approches statistiques en tentant de caractériser des attracteurs métaboliques et leurs zones de transitions. Les auteurs identifient ainsi l'existence d'attracteurs locaux dans ce paysage métabolique, qu'ils ramènent à des phénotypes connus. Ils montrent notamment un état prolifératif associé à une excrétion plus importante de lactate, un état métastatique correspondant à un métabolisme majoritairement oxydatif et un état "normal" qui correspondrait à un phénotype de cellule saine (figure 1.10).

Chaque bassin est plus ou moins large en fonction des paramètres épigénétiques choisis pour la cellule et de la disponibilité des ressources dans le milieu. De la même manière entre chaque bassin d'attraction des couloirs de transition sont visibles. Ce qu'ils montrent par là c'est qu'avec un même circuit métabolique la cellule peut transiter entre plusieurs bassins métaboliques (qui ne se résument d'ailleurs pas à des modes binaires bien segmentés) sans pour autant avoir besoin de subir des mutations ou des déprivations complètes de nutriments. Leur approche néanmoins est statistique et n'adresse pas la temporalité des transitions ni la répartition spatiale des phénotypes au sein d'un tissu tumoral. Il s'agit simplement de la probabilité pour une cellule de se situer dans un état particulier du paysage métabolique (ou espace des dimensions métabolique) en fonction des conditions auxquelles elle est soumise. Les modifications génétiques-épigénétiques vont quant à elles préciser la "facilité" à passer d'un bassin d'attraction à l'autre. Les simulations que j'ai réalisées et qui seront détaillées au chapitre 4 se basent sur et étendent ce modèle.

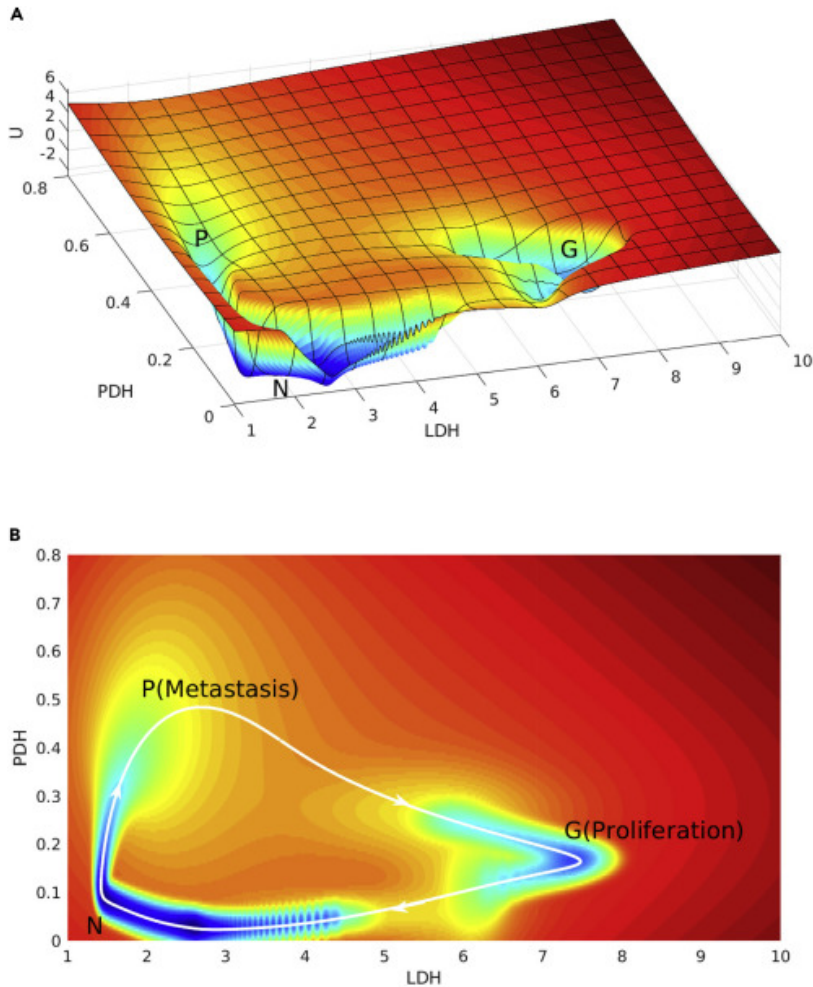


FIGURE 1.10 – The Landscape of Cancer Metabolism Oscillation. Figures extraites de "Uncovering the Underlying Mechanisms of Cancer Metabolism through the Landscapes and Probability Flux Quantifications" [10.1016/j.isci.2020.101002](https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101002)

1.3.2 Homéostasie et atteignabilité

L'homéostasie se définit comme une condition ou un état dans lequel le vivant (dans ses différentes échelles structurelles) est maintenu car considéré comme optimal et bénéfique [85]. On pourrait voir cela comme l'ensemble des conditions (pH, température, pression, nutriments, etc.) qui permettent à l'organisme de se maintenir tel quel le plus longtemps possible. L'homéostasie au regard de la cellule, du tissu ou de l'organisme correspond non pas à la recherche d'un état stationnaire absolu parfait et inconditionnellement stable, mais à un minimum local acceptable pour sa survie. Dans le paysage métabolique cela correspond au maintien au sein d'un bassin d'attraction. Que peut faire une cellule, une fois qu'elle se retrouve dans cet état? Elle a, à mon sens deux possibilités. La première est de se spécialiser pour cet état. Cela reviendrait à isoler les mécanismes superflus qui n'ont pas d'utilité à l'instant précis et qui ne devraient pas en avoir dans le futur immédiat. Cela minimise l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire et permet d'augmenter la survie. La deuxième possibilité c'est d'accepter momentanément de la variabilité interne (type

[85]: BILLMAN (2020), « Homeostasis : The Underappreciated and Far Too Often Ignored Central Organizing Principle of Physiology »

[86]: GLADE (2022), « Le Vivant Rare, Faible et Amorphe. Evolution depuis les Origines jusqu'à la Vie telle qu'elle nous Apparaît. »

mutation) ou subie (par l'environnement) afin de trouver un état encore plus stable. Ce deuxième point est d'autant plus vrai au niveau d'une population. Effectivement le seul moyen de sortir d'un attracteur est d'accepter cette variabilité. L'articulation de ces deux mécanismes qui décrit finalement les trajectoires effectuées au sein du paysage phénotypique, se fait selon N. Glade [86], par le biais de deux composantes intrinsèques et une extrinsèque :

- La robustesse du phénotype cellulaire : c'est-à-dire la conservation de fonctions malgré les variations de l'environnement, par de multiples redondances au niveau du code génétique, dans le rôle des acides aminés ou de voies métaboliques, des points de contrôles.
- L'évolutivité : la capacité à muter et autoriser de nouveaux comportements/fonctionnements des systèmes de l'organisme.
- La viabilité : l'ensemble des contraintes environnementales de natures physico-chimiques, radiatives, mécaniques, sociales, etc. Ces contraintes testent, éprouvent, le phénotype.

De ces trois composantes, il émerge la notion d'atteignabilité qui décrit en quelque sorte la capacité d'un organisme à évoluer vers de nouveaux comportements/phénotypes tout en conservant ses fonctions générales et en assurant sa survie [86]. On peut penser que dans le cas du cancer, l'hétérogénéité est la résurgence à l'extrême de ces composantes, chacune étant impliquée d'une manière ou d'une autre dans les processus en jeu. Il convient également de préciser que l'homéostasie cellulaire n'est peut-être pas toujours compatible avec l'homéostasie tissulaire ou de l'organisme. L'équilibre ou le déséquilibre engendré par la recherche d'homéostasie à différentes échelles structurelles de l'organisme (en particulier chez les organismes pluricellulaires) peut être une force motrice dans le déplacement au sein du paysage phénotypique.

Considérations épistémologiques

Ce chapitre a pour objectif de réunir les différentes réflexions et constats qui ont émergés lors de ces trois dernières années à étudier le métabolisme des tumeurs. Dans un premier temps je reviendrai sur l'effet Warburg et sur les concepts qui y sont associés dans la littérature scientifique. Ensuite je parlerai de la vision moderne de la biologie concernant la cellule, de son "programme" et l'anthropomorphisme associé. Dans une dernière partie je parlerai de la place de l'évolution vis-à-vis du cancer, d'écologie tumorale et de la théorie ataviste.

2.1 Évolution de la littérature - le métabolisme tumoral de Warburg à nos jours

L'existence de cette partie provient du constat survenu au début de ma thèse que la notion de "*métabolisme tumoral*" était très floue. Lorsque j'ai commencé mon stage de Master 2, qui a initié mon sujet de thèse, je devais modéliser l'effet Warburg par un modèle d'automate cellulaire. Je ne connaissais pas particulièrement l'effet en question en dehors de ce que j'en comprenais à partir de mes cours de biochimie à l'Université. La première publication que je lus, fut celle d'Otto Warburg lui-même "*On the origin of Cancer Cells (1956)*" [52].

2.1.1 Observation de Warburg en 1956

Dans sa publication [52] il y décrit les différentes expériences qu'il a effectuées, montre l'augmentation de la fermentation (production d'acide lactique) et mesure la quantité d'ATP produite par des cellules cancéreuses de rats et souris. Il distingue plusieurs comportements : des cellules qui fermentent et qui arrivent à maintenir le même niveau d'ATP que des cellules saines et des cellules qui ne maintiennent pas ces niveaux d'ATP et qui finissent par mourir par "manque d'énergie". Pour lui le scénario de la genèse des cellules cancéreuses se découpe ainsi : la respiration des cellules saines est endommagée (chimiquement ou par itération successive d'asphyxies provoquées). Les cellules se retrouvent ensuite dans un état de stress où elles ne respirent plus correctement et essaient de fermenter de plus en plus pour compenser le manque d'ATP qui en résulte. Au cours de ce processus d'accroissement de la fermentation, très lent et progressif sur plusieurs générations cellulaires

2.1	Évolution de la littérature - le métabolisme tumoral de Warburg à nos jours	25
2.1.1	Observation de Warburg en 1956	25
2.1.2	Glycolyse aérobie et la notion de switch	30
2.1.3	"Reverse Warburg effect" et la remise en question d'un phénotype universel	32
2.2	Anthropomorphisme et cellule	35
2.2.1	La reprogrammation métabolique	36
2.3	La place de la cellule tumorale dans l'évolution	40
2.3.1	L'évolution à l'échelle d'un cancer	41
2.3.2	Le cancer dans l'évolution	42

Comment est-on passé de l'observation d'Otto Warburg qui se résume finalement à "augmentation de la production de lactate dans les cellules cancéreuses" à "dérégulation du métabolisme vers la glycolyse aérobie"? Je souhaite avant de continuer plus loin, remarquer qu'il est tout à fait possible et parfois souhaitable de préciser des concepts et de changer leurs définitions qui évoluent avec le temps. Il me semble cependant nécessaire que ces évolutions soient conscientisées par tous et convenues formellement sans quoi la dérive naturelle d'une définition porte préjudice au discours scientifique. Revenons maintenant sur les prémisses énoncées plus haut. La figure 2.2 précise l'évolution de la perception de l'effet Warburg.

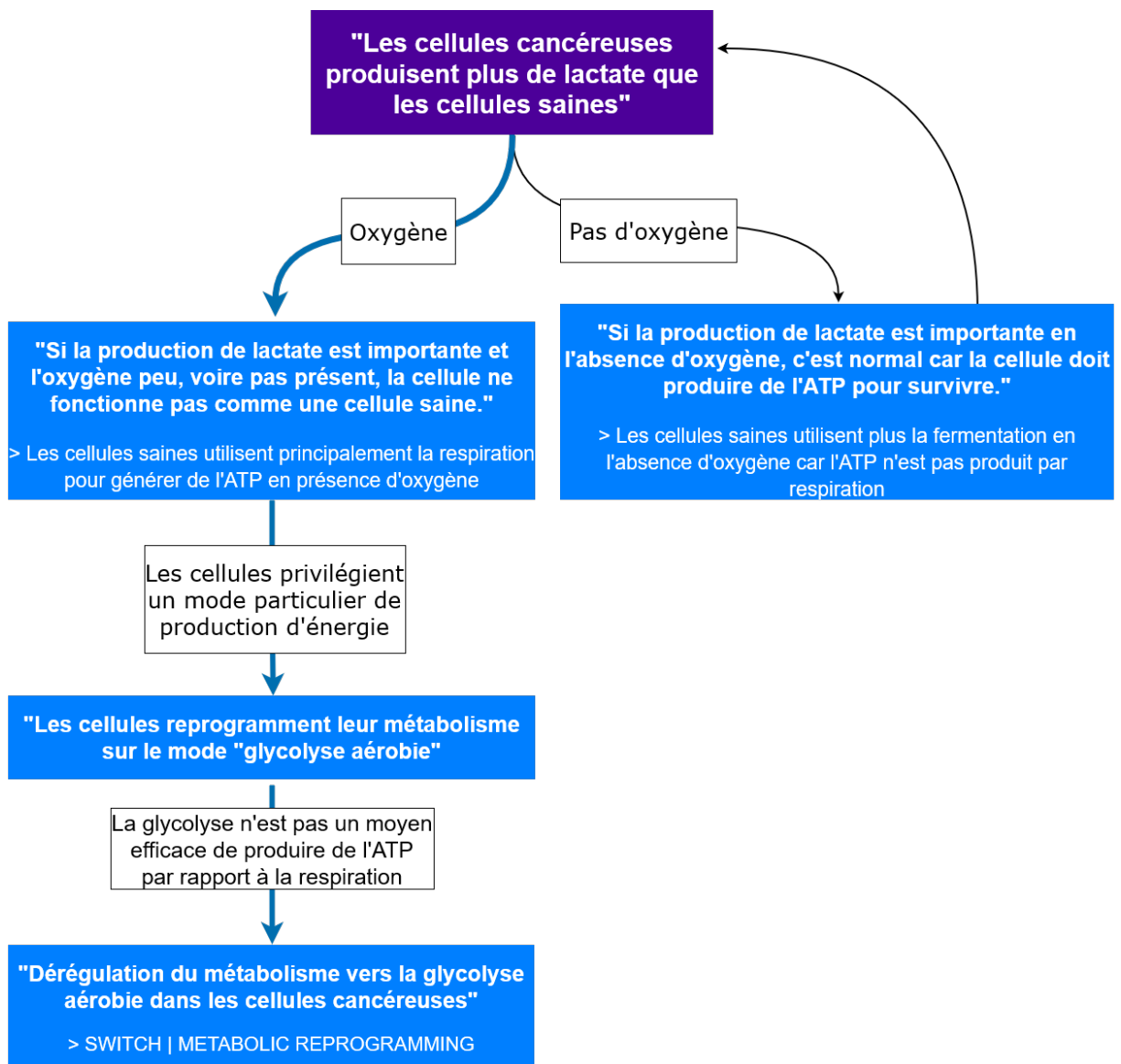


FIGURE 2.2 – Prémisses amenant à la définition moderne de l'effet Warburg. Le cadre violet est l'observation première d'Otto Warburg en 1956 [52]. Les cadres bleus sont les prémisses et les cadres blancs les postulats qui les sous-tendent. La flèche bleue correspond à l'évolution progressive de la définition.

Note 1

En anglais : "I shall not consider aerobic fermentation, which is a result of the interaction of respiration and fermentation, because aerobic fermentation is too labile and too dependent on external conditions. Of importance for the considerations that follow are only the two stable independent metabolic processes, respiration and anaerobic fermentation-respiration, which is measured by the oxygen consumption of cells that are saturated with oxygen, and fermentation, which is measured by the formation of lactic acid in the absence of oxygen."

[92]: RAZUNGLES et al. (2013), « L'effet Warburg »

Note 2

En anglais : "The mysterious latency period of the production of cancer is, therefore, nothing more than the time in which the fermentation increases after a damaging of the respiration. This time differs in various animals; it is especially long in man and here often amounts to several decades, as can be determined in the cases in which the time of the respiratory damage is known-for example, in arsenic cancer and irradiation cancer.

...

Since the increase in fermentation in the development of cancer cells takes place gradually, there must be a transitional phase between normal body cells and fully formed cancer cells."

Toutes les définitions ne conduisent pas à l'idée finale de dérégulation du métabolisme et de nombreux auteurs s'arrêtent sur différentes définitions qui dépendent des prémisses qu'ils choisissent. Le problème au-delà de la véracité des définitions, provient de l'intégration d'hypothèses de travail parmi les observations tangibles. L'effet Warburg, c'est un constat, celui de l'augmentation de la production de lactate (et une plus grande consommation de glucose) dans le cancer. Dans la mesure où les mécanismes qui aboutissent à ce constat ne sont pas encore bien connus, définir l'effet Warburg par son explication plutôt que par son observation tangible est source de biais. Warburg lui-même cherchait à expliquer ses observations en émettant l'hypothèse que les mitochondries étaient endommagées alors qu'on sait que ce n'est majoritairement pas le cas. Ainsi on observe des contradictions entre les observations de Warburg (qui ont bien sur été refaites depuis) et ce que l'on peut lire dans la littérature sur des textes le citant.

Par exemple Warburg dit [52]¹ :

"Je n'aborderai pas la fermentation aérobie, qui résulte de l'interaction de la respiration et de la fermentation, car la fermentation aérobie est trop labile et trop dépendante des conditions extérieures. Seuls les deux processus métaboliques indépendants stables sont importants pour les considérations qui suivent, la respiration et la fermentation-respiration anaérobie, qui est mesurée par la consommation d'oxygène des cellules saturées en oxygène et la fermentation, qui est mesurée par la formation d'acide lactique en l'absence d'oxygène."

Et dans une publication de 2013 [92], par exemple, les auteurs écrivent :

"Dans certains cancers, l'AMPK participe également à la régulation de l'effet Warburg lorsqu'il existe des mutations de la kinase LBK1 qui bloquent les fonctions d'AMPK et de ses cibles en aval. En effet, son inactivation entraîne une augmentation de la glycolyse aérobie (l'effet Warburg), une augmentation de la croissance tumorale et la transformation du glucose en lipides."

Warburg insiste plus loin sur la notion de progression entre les deux phases métaboliques² :

"La mystérieuse période de latence de la production du cancer n'est donc rien d'autre que le temps pendant lequel la fermentation augmente après un endommagement de la respiration. Ce temps diffère chez

divers animaux ; elle est particulièrement longue chez l'homme et s'élève ici souvent à plusieurs dizaines d'années, comme on peut le constater dans les cas où l'on connaît l'époque de l'atteinte respiratoire - par exemple, dans le cancer due à l'arsenic et le cancer d'irradiation.

...

Étant donné que l'augmentation de la fermentation dans le développement des cellules cancéreuses se fait progressivement, il doit y avoir une phase de transition entre les cellules normales du corps et les cellules cancéreuses complètement formées."

Et en 2020 [93] la notion de switch et de reprogrammation a pris le pas, suggérant plus l'idée de modification génétique en un point dans le temps que d'acquisition progressive de ce nouveau phénotype³ :

"L'effet Warburg est plutôt un élément crucial du phénotype cancéreux et une caractéristique centrale de la reprogrammation métabolique "égoïste" des cellules cancéreuses qui est considérée comme une caractéristique du cancer (Hanahan & Weinberg, 2011). Le passage à la glycolyse aérobie (c'est-à-dire la conversion du glucose en pyruvate) suivie de la formation de lactate est acquise très tôt dans la cancérogenèse (oncogénèse), avant même que les cellules tumorales ne soient exposées à des conditions hypoxiques (Vander Heiden et al. 2009)."

Le but n'est pas de pointer du doigt l'intégralité des articles en contradiction avec l'observation première mais de relever le risque de confusion lorsque la définition intègre des débuts d'explications amenées à changer avec le temps. Ainsi la figure 2.3 montre que la recherche autour de l'effet Warburg au cours des années 2000 s'est centralisée autour de l'expression génique (augmentation des termes "expressions" / "gene-expression" et diminution du terme "diffusion" principalement étudié dans le cadre du métabolisme dans les années 90) et le terme "aerobic glycolysis" a pris une part très importante dans la plupart des articles.

Il pourrait être utile de laisser l'effet Warburg à sa définition première et de donner de nouveaux noms aux hypothèses et explications qui tentent de l'expliquer. En ce sens parler de "switch" et "metabolic reprogramming" est tout à fait correct lorsque leurs utilisations visent à préciser une théorie (plus qu'un courant de pensée) expliquant l'effet. Cela permet de discuter et éventuellement remettre en question ces notions sans bousculer tout le

[93]: VAUPEL et al. (2021), « Revisiting the Warburg effect : historical dogma versus current understanding »

Note 3

"The Warburg effect is instead a crucial component of the malignant phenotype and a central feature of the 'selfish' metabolic reprogramming of cancer cells which is considered a "hallmark of cancer" (Hanahan & Weinberg, 2011). The switch to aerobic glycolysis (i.e. the conversion of glucose to pyruvate) followed by lactate formation is acquired very early in carcinogenesis (oncogenesis), even before tumour cells are exposed to hypoxic conditions (Vander Heiden et al. 2009)."

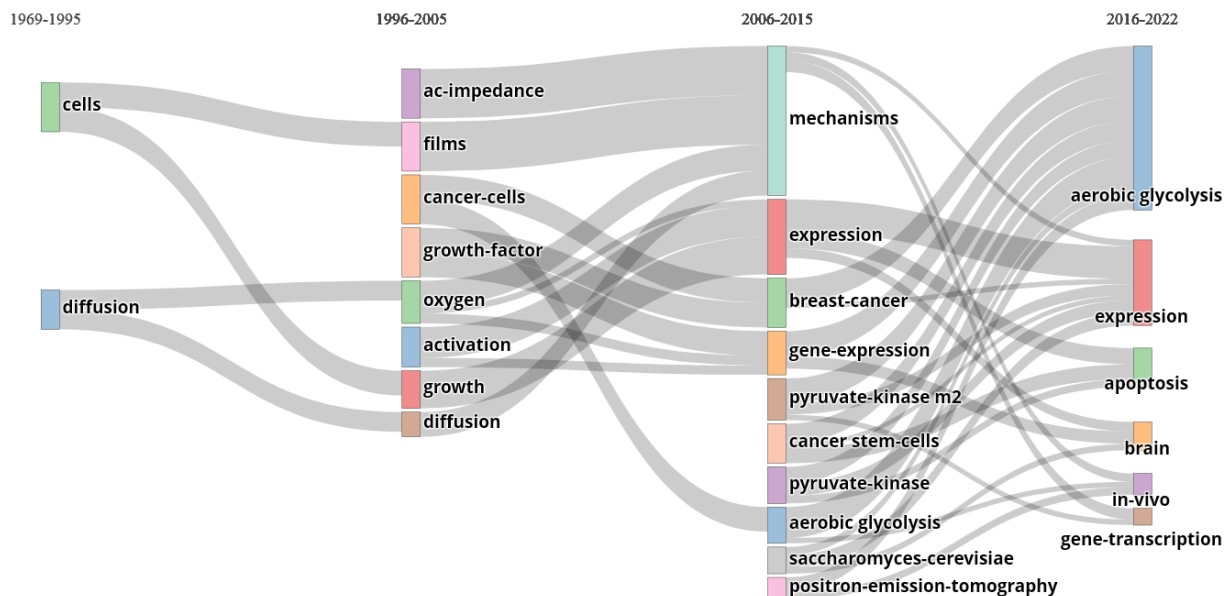


FIGURE 2.3 – Évolution thématique : mots clés sur l'effet Warburg coassociés au sein des articles. Ce diagramme de Sankey a été généré avec le package R bibliometrix (version 3.2.1) sur 3128 documents extraits de la base de donnée World of Science pour les articles entre 1969 et 2022 incluant le terme "Warburg effect" dans le titre, l'abstract ou en mots clé. Trois dates (1995-2005-2015) ont été choisies pour segmenter la chronologie.

champ lexical du métabolisme tumoral. C'est ce que je vais essayer de faire dans les sections suivantes.

2.1.2 Glycolyse aérobie et la notion de switch

Comme dit dans le chapitre précédent, il est largement établi maintenant que le cancer n'utilise pas un unique mode métabolique de production d'énergie (ATP) [94]. Par cancer, on peut cependant demander de quel niveau on parle. De cellules? Du tissu tumoral en entier? Parmi toutes les questions sans doute très naïves qui ont jalonné ces trois dernières années, celle de la capacité (technique) de mesurer des paramètres métaboliques à l'échelle cellulaire était centrale. Lorsque des articles disent par exemple "les cellules de notre lignée X produisent 70% de leur ATP par fermentation en présence d'oxygène", comment est-on sûr que chacune des milliers/millions de cellules de leurs échantillons produisait effectivement 70% de leur ATP par glycolyse? Qu'elles avaient toutes bien accès à l'oxygène? L'expérimentateur avait-il mesuré tous ces paramètres à l'échelle cellulaire une par une? Est-ce une mesure moyenne à grande échelle? Si tel est le cas, comment être certain qu'on ne passe pas à côté de toute une communauté cellulaire métaboliquement différente. Bien souvent, la plupart des mesures se font avec des appareils comme des "Seahorse XF Analyzers" qui mesurent une consommation et production extracellulaire moyenne des substrats [95], les mesures à l'échelle cellulaire étant très coûteuses à réaliser bien que cela tende à changer.

[94]: JIA et al. (2019), « Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways »

[95]: WANG et al. (2013), « Oxygen Flux Analysis to Understand the Biological Function of Sirtuins »

Il est ainsi intéressant de noter qu'alors que l'accent est mis sur la glycolyse aérobie en insistant sur la présence d'oxygène pour "les" cellules, la littérature s'accorde à dire que les tumeurs sont très souvent hypoxiques pour une grande partie de leur tissu [96, 97]. Il est très tentant de penser comme je l'ai fait à plusieurs reprises que les cellules n'ont pas réellement accès à l'oxygène et que les tissus tumoraux sont asphyxiés ce qui entraîne l'augmentation de la production de lactate. Problème résolu. Plus sérieusement, le problème central vis-à-vis du cancer et plus largement en biologie, c'est la volonté de comprendre les grandes lois qui régissent le vivant en composant avec l'extrême hétérogénéité qui le caractérise. Il faut donc chercher des modèles unifiés dans lesquels la fermentation aérobie, anaérobie et la respiration existent au sein d'un même tissu. Le cancer fonctionnant en glycolyse aérobie est un modèle insuffisant au regard de l'hétérogénéité. Cela constitue le premier point de remise en question de cette notion.

Le deuxième point est directement relatif à la biochimie. En soit, la *glycolyse* aérobie n'a absolument rien d'anormal, pour alimenter le cycle de Krebs, il faut créer du pyruvate, qui provient majoritairement de la transformation du glucose dans la glycolyse. Sans ça pas (ou peu) de respiration. Il serait plus juste de parler de fermentation aérobie pour intégrer glycolyse + transformation du pyruvate en lactate (voir figure 1.9). Cette dichotomie entre glycolyse et cycle de Krebs-oxphos n'a pas lieu d'être. Elle est le reflet de la confusion sémantique qui entoure ces voies et elle encourage la vision de deux modes métaboliques différents et donc l'idée de "switch", de "bascule" de l'un à l'autre. Dans un modèle génocentré, le circuit génétique adresse le comportement de la cellule. Une modification des flux aussi marquée ne peut donc qu'être issue d'un "switch" (au sens donné en électricité : commutateur). Si tel est le cas il faut trouver comment cette idée s'articule avec l'instauration très progressive de la fermentation que Warburg a décrite. On pourrait avancer que le temps n'empêche en rien la mise en place d'une série de mutations ou de modifications épigénétiques aboutissant à ce résultat. Il me semble cependant que cette idée n'est finalement pas réellement compatible avec ce qu'est un switch, un commutateur, le passage d'un état A à un état B. Il n'y a pas d'état intermédiaire entre les deux.

Warburg aurait dit vers la fin de sa carrière la phrase suivante (plus ou moins empruntée à Max Planck) :

"La science ne progresse pas parce que les scientifiques changent leurs idées, mais parce que les scientifiques bloqués dans des idées erronées meurent, puis sont remplacés" [98].

On pourrait sourire quant à ses motivations, Warburg étant frustré par la difficulté à faire accepter ses idées de mitochondries

[96]: Muz et al. (2015), « The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy »

[97]: NEJAD et al. (2021), « The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell : a novel approach to developing treatment »

[98]: CASSIM et al. (2020), « Warburg and Beyond : The Power of Mitochondrial Metabolism to Collaborate or Replace Fermentative Glycolysis in Cancer »

endommagées, au sein de la communauté scientifique. Je me demande cependant quelle est la part de cette affirmation si elle est avérée, attribuable à la manière dont des concepts abstraits prennent substance au travers de nos mots et des expressions que l'on emploie.

2.1.3 "Reverse Warburg effect" et la remise en question d'un phénotype universel

[99]: PAVLIDES et al. (2009), « The reverse Warburg effect : Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma »

[100]: GLADDEN et al. (2011), « Fuel for cancer cells ? »

[101]: SCHILIRO et al. (2021), « Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation »

L'effet Warburg inverse, est le terme employé par Stephanos Pavlides et al. en 2009 dans l'article *"The reverse Warburg effect : Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma"* [99]. Il désigne un modèle métabolique "à deux compartiments" dans lequel les cellules cancéreuses sont en relation symbiotique avec les CAFs (Cancer associated fibroblasts). Ici ce ne sont pas les cellules cancéreuses qui expriment l'effet Warburg mais les fibroblastes aux alentours. Les cellules cancéreuses créent un stress oxydatif qui induit ce comportement dans les CAFs (figure 2.4). Ces dernières excrètent en retour du lactate capté par les cellules cancéreuses qui le retransforment en pyruvate pour réalimenter la production d'ATP dans la mitochondrie. L'hypothèse s'est progressivement étendue chez certains auteurs [100, 101], en intégrant une dichotomie plus simple : "cellules cancéreuses oxydatives" et "cellules cancéreuses glycolytiques". Plus largement c'est un modèle qui décrit comment au sein d'une même tumeur des cellules cancéreuses avec des profils métaboliques différents s'organisent pour répartir leurs ressources, la production des unes servant à la consommation des autres.

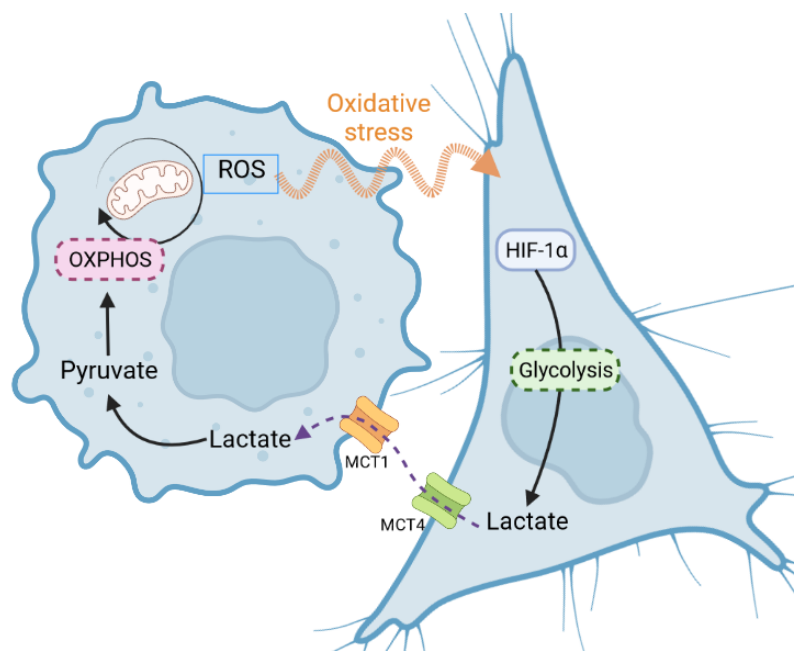


FIGURE 2.4 – "Reverse Warburg effect" : Une cellule cancéreuse (à gauche) crée un stress oxydatif dans la cellule cancéreuse (à droite) en produisant des ROS (reactive oxygen species). La cellule de droite va massivement produire du lactate qui une fois excrété sera utilisé par la cellule de gauche sous forme de pyruvate pour réalimenter l'OXPHOS.

Ce modèle à deux compartiments est intéressant car il suggère qu'au sein de cette apparente désorganisation métabolique, l'égoïsme cellulaire céderait sa place à une forme d'organisation symbiotique. Cette organisation pourrait se mettre en place en fonction des différences d'expositions aux nutriments, au pH. Ce besoin de modèle alternatif provient essentiellement de la nécessité d'expliquer l'hétérogénéité dont j'ai parlé plus haut. De ce fait, l'effet Warburg n'est plus une caractéristique universelle du métabolisme tumoral mais seulement une de ces expressions. L'expression "metabolic switch" commença alors à être progressivement (relativement) moins utilisée (figure 2.5) que l'expression "metabolic reprogramming" plus permissive dans l'interprétation d'un changement de phénotype.

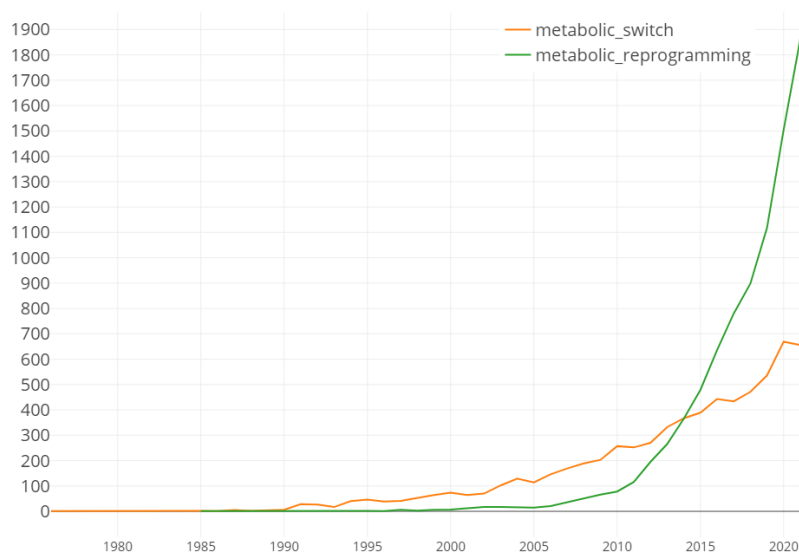


FIGURE 2.5 – Evolution du nombre de publications associées aux termes "metabolic reprogramming" et "metabolic switch" : Résultats obtenus à partir de la base de donnée *World of Science* à partir de leur titre, l'abstract ou en mots clé.

Ainsi plutôt que d'insister sur l'idée que la cellule passe universellement d'un phénotype A vers un phénotype B, la cellule cancéreuse se "reprogramme" vers un phénotype considéré anormal pour des raisons que l'on s'évertue à mettre en lumière. L'évolution du concept (qui n'est cependant pas encore pleinement adopté, l'idée de switch étant encore très ancrée) est un pas en avant vers la prise en compte de l'hétérogénéité. En forçant le trait, il peut être amusant de remarquer que finalement nous nous retrouvons avec deux phénotypes ("Warburg" et "Warburg inverse") qui décrivent peu ou prou les deux modes classiques (*et physiologiques*) de production d'énergie de la cellule. Au lieu de parler d'évaporation on parle de condensation inverse.

Je prie le lecteur de croire en l'absence de mauvaise volonté de ma part, dans mon utilisation d'analogies qui ont leurs limites. Je ne cherche pas à ôter la complexité du sujet et à présenter ces notions comme des concepts inutilement compliqués mais simplement

relever la possibilité qu'il se construit trop de systèmes de pensée "discrets". J'entends par là de catégoriser à l'infini des particularités au risque de ne plus chercher à les unifier au travers de modèles continus. On en revient encore à la question "comment prendre en compte l'hétérogénéité du vivant?".

[102]: GOETZ et al. (2018), « Personalized medicine : motivation, challenges, and progress »

La tendance actuelle est à la médecine personnalisée (c'est-à-dire trouver des solutions thérapeutiques spécifiquement adaptées aux caractéristiques et particularités de chaque patient soigné) [102]. C'est la juste réponse au constat que toutes les tumeurs sont différentes et qu'elles doivent donc être traitées différemment. Mais à quel point ces tumeurs sont-elles différentes? Y a-t-il encore un intérêt à chercher à comprendre "le cancer" si finalement la variabilité qui le constitue est supérieure à son "invariabilité"? On peut imaginer que le problème se résume à la capacité de trouver le point névralgique du cancer. Le moment de l'existence de la cellule où, quel que soit ce qui a provoqué son état ou la direction qu'elle va prendre, la cellule devient "cancéreuse".

Si nous étions capables de déterminer ce point précis il serait envisageable de chercher à l'éviter. Si ce point n'existe pas alors il faudrait se résoudre à considérer le cancer comme simple qualificatif pour des comportements cellulaires similaires. Il me semble qu'aucun consensus dans la littérature n'a été trouvé autour de cet hypothétique point névralgique. Il y a donc, il me semble, deux recherches : une qui vise à déterminer l'existence de ce point en tentant de créer des modèles unificateurs sur l'émergence du cancer et sur les trajectoires qu'il peut emprunter (le point de bascule dans le temps) [103] et une qui vise à mieux décrire et comprendre les manifestations de cette hétérogénéité [104].

[103]: NIIDA et al. (2020), « A unified simulation model for understanding the diversity of cancer evolution »

[104]: HAUSSEY et al. (2019), « Tumor diversity and the trade-off between universal cancer tasks »

Cette question se pose nécessairement à chaque fois que des comportements contradictoires émergent. Si je souhaite avoir un modèle mathématique du métabolisme des tumeurs dois-je faire un modèle émergent ou deux modèles phénoménologiques? Un pour les cellules cancéreuses qui respirent et un pour les cellules qui fermentent. Faire un modèle unique présuppose l'existence d'un mécanisme responsable de l'émergence des deux phénotypes qui pourrait ne pas correspondre à la réalité. Faire deux modèles phénoménologiques permettra sans doute de mieux comprendre les spécificités de chacun mais empêchera de l'évaluer dans un contexte commun.

2.2 Anthropomorphisme et cellule

L'anthropomorphisme, comme "tendance à se représenter toute réalité comme semblable à la réalité humaine" (*définition CNRTL*) est une habitude ancienne en science et particulièrement en biologie [105]. Il est utilisé pour décrire des comportements observés se rapprochant des nôtres, nous humains. Cela sous-entend souvent une intention : "la cellule se défend contre les agressions extérieures", "la bactérie triche et dupe le système immunitaire", "le virus mute pour s'adapter à l'homme". Dans ce prêt d'intention, il y a l'idée que les processus dont le vivant est acteur ne sont pas là par hasard et qu'ils servent un but. Cela fait pourtant énormément débat car autant il est facile de dire qu'une bactérie cherche à se nourrir pour survivre autant il est difficile scientifiquement d'en déduire une conscience ou une volonté de le faire. On expliquera que l'évolution a mis en place un ensemble de processus permettant à la bactérie d'être attirée par des éléments qu'elle intégrera pour pérenniser sa structure. Il est cependant plus commode et plus parlant de donner l'intention à la bactérie de manger, de la même manière que nous le ferions nous-même. Quelle que soit la réflexion sur la conscience du vivant, l'usage de ces anthropomorphismes a inévitablement des répercussions sur la façon dont on pense les mécanismes biologiques et comment on les véhicule.

Lorsque l'on évoque le cancer on se retrouve face à une situation particulière car il s'agit d'un processus invasif qui n'est pas provoqué par du "non-soi". Nous sommes habitués au "non-soi" qui nous attaque : des virus, certaines bactéries ou encore des parasites. Ces organismes vivants ou non (pour les virus), sont bien identifiés en tant qu'entités "nous voulant du mal". En 2018, une étude [106] publiée par l'Institut national du cancer en collaboration avec Santé publique France décrit les regards et perceptions des Français sur le cancer en 2015. Dans cette étude, le cancer y est vu comme une maladie et la plus grave, fortement associée à la mort et qui engendre du dégoût. De manière générale les mots associés au cancer sont souvent ceux des facteurs exogènes qui pourraient le provoquer. Il renvoient à "l'invasion du corps par la maladie et les métastases annonciatrices d'une mort prochaine, au fantasme de dévoration par le crabe" [107]. Pourtant, ici, c'est le "soi" qui est impliqué. Comment une partie de "soi", peut-elle chercher à nous dévorer ? Si l'on admet que le "non-soi" puisse le faire, le cancer devient quelque part une forme de "non-soi" chargée d'intentions individualistes.

Au fond est-ce le cas ?

Comme dis précédemment la perception actuelle du cancer est majoritairement "généocentrée" et déterministe [108]. C'est l'inté-

[105]: YANAI et al. (2020), « The two languages of science »

[106]: FOUCAUD et al. (2018), « Baromètrecancer 2015. Cancer et facteurs de risque. Opinions et perceptions de la population française. »

[107]: REICH (2009), « Cancer et image du corps : identité, représentation et symbolique »

[108]: HEAMS (2004), « An endodarwinian approach of intercellular variability of gene expression »

rieur qui agit sur l'extérieur, l'ADN qui induit, la cellule qui se multiplie, qui mute, qui se **reprogramme** [63]. Dans un système plus "exocentré" où c'est l'environnement qui serait responsable de la majorité des événements, il paraîtrait plus naturel de parler des cellules passivement. La cellule subirait des contraintes, des mutations, etc. Nuls doutes qu'il y aurait d'autres écueils. Néanmoins, les approches théoriques visant à comprendre "le cancer", sont empreintes de ces choix conceptuels : "coupables" ou "victimes" ?

Cela m'amène donc à revenir sur la notion de reprogrammation métabolique dont il a déjà été question.

2.2.1 La reprogrammation métabolique

Dans des publications récentes, certains auteurs définissent la reprogrammation métabolique comme « *changements de la bioénergétique cellulaire tumorale* » [63]; "*phénomène où les cellules cancéreuses reprogramment certains de leurs métabolismes* " [109]; "*la capacité des cellules cancéreuses à modifier leur métabolisme afin de supporter l'augmentation de la demande d'énergie [...]*" [89] ou "*mécanisme par lequel les cellules recâblent leur métabolisme pour favoriser la prolifération et la croissance cellulaire*" [110]. Ces définitions concernent de près ou de loin l'effet Warburg.

Ces définitions suggèrent également que les cellules cancéreuses conduisent leur métabolisme dans un état « non physiologique » afin de répondre à leurs besoins. Ici l'anthropomorphisme est clair, c'est la cellule qui choisit de transformer son métabolisme pour atteindre un objectif précis. Il y a vingt-cinq ans, la « reprogrammation métabolique » était liée à une origine génétique / épigénétique. Il peut être tentant d'associer modifications génétiques et « reprogrammation » à cause de la culture computationnelle en science et plus récemment en biologie. Mais s'il y a "reprogrammation", la cellule doit contenir un programme modifié impliquant à la fois l'existence d'un programme et une version alternative de ce programme. Le concept de « programme » en biologie est souvent débattu et ne fait pas consensus. Le problème est lié à la métaphore longuement discutée de la "cellule-machine" [111, 112]. Une bonne critique à ce sujet a été faite par BOUDRY et PIGLIUCCI [113]. L'idée de « reprogrammation », au-delà de sa problématique sémantique, est liée au concept de changement d'expression génique et de routage métabolique. Il est donc intéressant de voir si les cellules cancéreuses doivent nécessairement présenter un profil d'expression génique radicalement différent ou des modifications structurelles particulières pour adopter un métabolisme différent.

Est-il possible d'identifier une caractéristique métabolique universelle unique des cellules cancéreuses malgré l'hétérogénéité

[109]: LI et al. (2020), « CaMeRe : A Novel Tool for Inference of Cancer Metabolic Reprogramming »

[110]: CARVALHO-SANTOS et al. (2020), « Cellular metabolic reprogramming controls sugar appetite in *Drosophila* »

[111]: KONOPKA (2002), « Grand metaphors of biology in the genome era »
[112]: McLEOD et al. (2017), « Synthetic biology, metaphors and responsibility »

[113]: BOUDRY et al. (2013), « The mis-measure of machine : Synthetic biology and the trouble with engineering metaphors »

tumorale? Peut-on considérer l'adaptabilité de la cellule comme l'acteur principal des transitions métaboliques au-delà des processus pathologiques?

Supposons qu'il existe un programme de métabolisme clairement établi en faisant l'analogie avec un programme informatique (*c'est-à-dire* une séquence d'instructions qui définissent l'ensemble du comportement d'un système). Dans ce cas, trois solutions émergent :

1. Les différents scénarios métaboliques font déjà partie du "programme" en tant que blocs conditionnels (*blocs if-else*). Tout est déjà présent dans la cellule, les fonctions se déclenchent en réponse à des signaux prédéfinis. Il n'y a donc pas de "reprogrammation".
2. Des parties du code sont *aléatoirement* ajoutées ou supprimées un peu comme les mutations aléatoires qui sont plus proches du gain / perte de fonctions. C'est donc un mécanisme évolutif classique et non une transformation en profondeur du programme lui-même.
3. Le programme et sa structure sont modifiés *de manière déterministe* de manière optimale et en une seule tentative (*copier-coller*). Un tel déterminisme qui échappe aux processus d'essais et d'erreurs n'est pas actuellement documenté en biologie.

Il est intéressant de noter que la première hypothèse appartient aux systèmes dynamiques qui sont prédéfinis par des lois et des règles. En tant que tels, ils sont totalement déterministes [114]. Si la cellule est un système dynamique, alors le programme est préexistant et il n'y a donc pas de reprogrammation puisque la structure du système est inchangée. Tous les comportements métaboliques, dans notre cas, sont ainsi pris en compte et ils émergent spontanément en fonction des contraintes externes sous forme d'attracteurs stables ou instables (y compris les états chaotiques).

Par opposition aux systèmes dynamiques, la cellule peut être décrite comme une entité sans règles prédéfinies et donc elle évolue constamment au sens darwinien (deuxième hypothèse). Cela signifie que la cellule est constitutivement instable (les règles peuvent changer) donc c'est un système non déterministe. Il fonctionne par essais et erreurs et atteint l'optimalité probabiliste grâce à la loi des grands nombres sous la pression de l'environnement [115].

Le programme d'une cellule cancéreuse est-il essentiellement différent d'une cellule normale [60]? Dans quelle mesure les changements observés dans le cancer peuvent-ils être attribués à des mutations, à une modification de l'expression génique ou à de nouvelles voies dans les réseaux métaboliques et dans quelle mesure peuvent-ils être attribués à un changement d'état « naturel

[114]: WOLKENHAUER et al. (2005), « The dynamic systems approach to control and regulation of intracellular networks »

[115]: SCARDOVI ITALO (2013), « Re-reading Darwin. Notes for a critical history of indeterminism »

[116]: PHAN et al. (2014), « Cancer metabolic reprogramming : importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies »

[117]: ORANG et al. (2019), « Micro-managing aerobic respiration and glycolysis in cancer cells »

[118]: MORRISH et al. (2008), « The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry »

[119]: INTLEKOFER et al. (2019), « Metabolic signatures of cancer cells and stem cells »

[120]: ZHANG et al. (2019), « Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation »

[121]: KUMARESWARAN et al. (2012), « Chronic hypoxia compromises repair of DNA double-strand breaks to drive genetic instability »

[122]: BALKWILL et al. (2001), « Inflammation and cancer : Back to Virchow ? »

[123]: MARINE et al. (2020), « Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer »

» à l'intérieur du paysage métabolique en réponse à des facteurs externes (comme dans le sens des systèmes dynamiques)?

Nous avons vu dans le chapitre 1 qu'il est maintenant bien établi que les cancers présentent tous des mutations et des modifications de l'expression génique avec notamment le gène TP53, affectant le métabolisme en inhibant, dans les cellules normales, la transcription des transporteurs du glucose (Glut1 et Glut4) [116]. La mutation de ce gène supprime une des barrières contre l'augmentation de l'expression de Glut trouvée dans les cellules cancéreuses. De nombreux autres gènes voient leur expression modulée dans le cancer avec de multiples répercussions sur le métabolisme : HIF-1 α affecte la réponse métabolique aux faibles concentrations d'oxygène [117], et c-Myc améliore la prolifération cellulaire, augmentant ainsi les besoins métaboliques [118].

Les mutations génétiques sont-elles les moteurs des modifications métaboliques de la cellule et transforment-elles ainsi l'environnement? Est-ce l'inverse [119]? Ou les deux? Récemment, 28 sites de lactylation de la lysine sur les histones (Kla) ont été identifiés [120], montrant qu'une concentration accrue de lactate conduit à une modification de Kla et de son expression génique associée. Un pH faible [121] ou des cellules environnantes soumises à une inflammation chronique, [122] sont connus pour favoriser la carcinogenèse et les dommages à l'ADN.

Il est difficile d'établir une hiérarchie temporelle de ces événements et de déterminer lequel est le premier. Nous sommes confrontés à des mécanismes complexes qui s'influencent mutuellement et tous sont des candidats potentiels pour être le « déclencheur » final du cancer. Il a été suggéré que la « reprogrammation métabolique » pourrait être une caractéristique du métabolisme lui-même et non spécifique aux cellules cancéreuses [14]. Si la capacité d'adaptation métabolique est inhérente à toutes les cellules, la spécificité des cellules tumorales pourrait résider dans la capacité accrue de le faire (en surexprimant des processus potentiellement préexistants) [60]. Certains comportements peuvent également ne jamais apparaître pour des cellules normales car les conditions environnementales nécessaires à l'apparition de ces phénotypes ne se produisent pas dans des conditions physiologiques. Il n'est alors pas déraisonnable d'envisager des transitions métaboliques sans altération génétique [123].

Cette adaptabilité métabolique doit être exprimée à plusieurs niveaux d'interactions. Les cellules intactes, (A sur la figure 2.6) interagissent avec l'environnement par des processus biochimiques (sécrétions, absorptions) et les propriétés thermodynamiques des enzymes impliquées permettent un premier niveau de régulation.

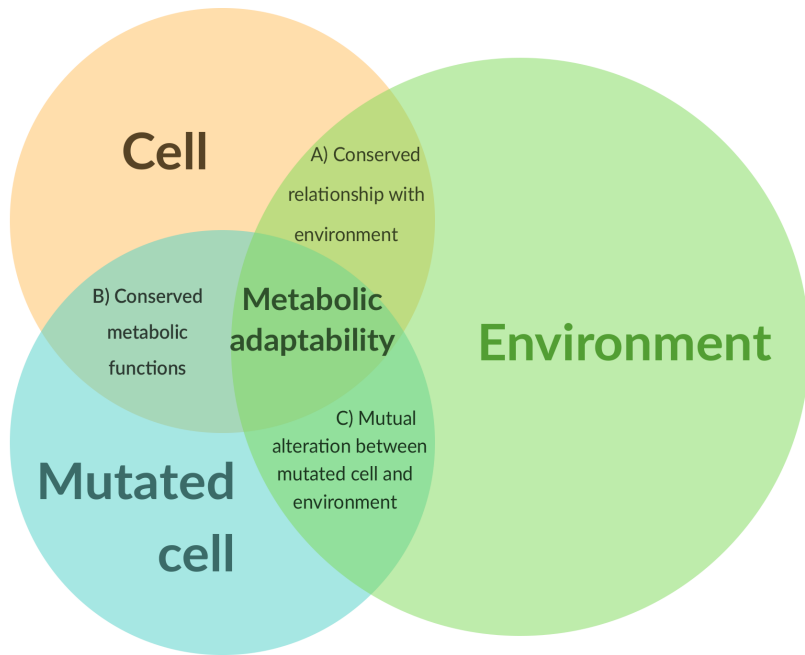


FIGURE 2.6 – Représentation schématique de l’adaptabilité métabolique. L’adaptabilité métabolique se situe à l’interface de la relation entre la structure cellulaire et son environnement au-delà des seules mutations.

L’épigénétique offre un deuxième niveau de régulation, en ajustant la relation cellule-environnement dans une limite acceptable (dépendante du contexte) pour la cellule et celles environnantes et permettant de maintenir l’intégrité de l’environnement. Certaines fonctions métaboliques (sinon la plupart) sont conservées lors des mutations (B sur la figure 2.6) et la majorité des mécanismes de régulation qui sont valides pour les cellules intactes sont également valables pour les cellules mutées. Mais, dans le contexte d’une cellule mutée (C sur la figure 2.6), la relation cellule-environnement peut être radicalement modifiée. Ces mutations peuvent augmenter l’expression des canaux ioniques [124] ou des transporteurs à la surface de la cellule modifiant la dynamique des échanges. Inversement, un environnement altéré peut lui-même favoriser des mutations au sein de la cellule. L’adaptabilité métabolique apparaît comme une propriété commune des cellules intactes et mutées par rapport à leur microenvironnement. La notion d’« adaptabilité » n’est pas spécifique à un type de cellule particulier même si cette capacité peut être plus ou moins favorisée au sein d’un duo cellule-environnement spécifique [125].

Pour résumer, la reprogrammation métabolique est un concept fréquemment utilisé pour désigner les transitions métaboliques qui ont lieu dans les cellules tumorales. Cette notion semble conceptuellement bien comprise car elle fait écho à la culture informatique et suffit à illustrer une grande partie des processus observés. Cela pose cependant un premier problème sémantique, qui est de donner involontairement aux cellules cancéreuses un comportement anthropomorphe, une cellule capable de modifier par elle-même son propre code dans un but précis. Cela contribue peut-être à

[124]: LASTRAIOLI et al. (2015), « Ion channel expression as promising cancer biomarker »

[125]: BROOKS et al. (2010), « Adaptation of cells to new environments »

[126]: YUGI et al. (2017), « Metabolism-Centric Trans-Omics »

inciter la communauté à se concentrer sur l'étude des tumeurs au niveau génétique / épigénétique au détriment d'autres niveaux d'interactions moléculaires, même si cela tend à changer avec la montée des nouvelles études -omiques [14]. Les "trans-omics" [126] en particulier sont encouragés afin d'intégrer ces différents niveaux d'interactions. Le deuxième problème est de clarifier les mécanismes sous-jacents à cette « reprogrammation ». L'identification des « états cellulaires » par rapport à l'environnement peut aider à définir un paysage métabolique dans lequel les cellules peuvent transiter [84]. Il pourrait également être approprié de distinguer d'une part un métabolisme cellulaire et d'autre part un métabolisme / phénotype tissulaire. Une tumeur en tant que tissu, peut présenter un phénotype Warburgien, avec une forte consommation de glucose et une production de lactate, mais pas nécessairement partout et tout le temps, au niveau cellulaire [60]. Enfin, il peut être nécessaire de réintégrer la capacité de la cellule à transiter au sein de ce paysage métabolique, en adoptant plusieurs de ces états en fonction des conditions environnementales, en considérant son adaptabilité métabolique *ie* l'ensemble des mécanismes moléculaires réalisables par la cellule *avec* ou *sans* mutation lui permettant de survivre dans son environnement.

2.3 La place de la cellule tumorale dans l'évolution

[127]: SAUL et al. (2007), « Cancer as a consequence of the rising level of oxygen in the Late Precambrian »

[128]: PYE et al. (2015), « A second transmissible cancer in Tasmanian devils »

[129]: THOMAS et al. (2022), *L'abominable secret du cancer*

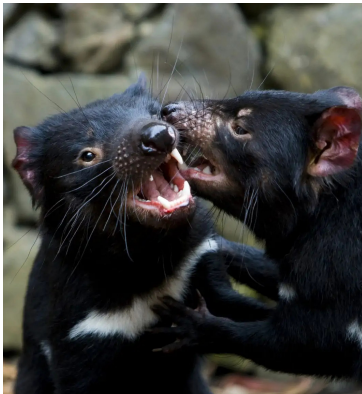


FIGURE 2.7 – Diabes de tasmanie
Credît : Dave Welsh/ VW Pics/ UIG

Le cancer est intrinsèquement associé au processus évolutif. Étant l'une des plus vieilles maladies il est associé à l'émergence de la multicellularité au précambrien il y a plus de 540 millions d'années [127]. Le cancer a une longue histoire aux côtés du vivant et pourtant il est souvent peu considéré comme une maladie ancrée dans notre histoire évolutive. Et pour cause sauf rares exceptions pour lesquelles il peut être transmissible (notamment un cancer de la face chez les diables de Tasmanie par le biais des morsures [128] - figure 2.7), il semble que le cancer débute à chaque fois son histoire avec son hôte. Chose plus étonnante, les cancers semblent adopter très rapidement de nouveaux comportements et développent des systèmes coopératifs intratumoraux sans feuilles de routes apparentes préalables [129]. De plus les constructions de tumeurs solides et le développement de la maladie sont très similaires entre individus et entre espèces différentes [129].

On peut l'envisager d'au moins deux manières sous l'angle évolutif. Soit tous les cancers lorsqu'ils apparaissent convergent vers des mécanismes similaires par sélection, soit le(s) processus permettant aux cancers d'émerger ont pour origine notre propre ADN et par extension tous éléments transmissibles entre générations. Ces

deux perspectives sont tout aussi importantes car elles mettent l'évolution dans son sens large au cœur du processus cancéreux. Comme le souligne Frédéric Thomas [129], l'oncobiote tumoral est bien une population d'individu, avec une écologie et une dynamique sociale.

2.3.1 L'évolution à l'échelle d'un cancer

Aborder une tumeur par des approches évolutives c'est tenter d'évaluer sa trajectoire depuis l'émergence des cellules précancéreuses dans le tissu jusqu'aux métastases qu'elle peut former. L'évolution de cet oncobiote ne passe pas exclusivement par l'étude de son génome mais également par l'étude des interactions qu'elle met en place avec les autres cellules de l'environnement ainsi que sa manière de terraformer cet environnement [130]. Soumise au processus Darwinien de sélection, la cellule cancéreuse ne prend une trajectoire évolutive que parce que l'ensemble des conditions du système défini dans le temps le lui permet. Si une mutation aléatoire survient, cette mutation ne se maintient que parce qu'elle ne compromet pas la survie à court terme des cellules dans l'environnement.

Cela est également valable pour les thérapies. Lorsque la population tumorale possède une variabilité génétique trop importante, il peut être dangereux de tenter de l'éradiquer d'un coup au risque de sélectionner des variants résistants et d'augmenter la malignité de la tumeur [131]. De la même manière, les thérapies ciblant le métabolisme ne peuvent fonctionner que si elles prennent en compte la variabilité métabolique spatialement et temporellement. Une hypothèse avancée par certains biologistes pour expliquer que notre système immunitaire soit aussi peu efficace dans la lutte contre les tumeurs est qu'il est peut-être moins coûteux de ne s'y attaquer que ponctuellement ou faiblement que de chercher à l'éradiquer totalement. En la tolérant et en se contentant de limiter les dégâts engendrés par la tumeur, le système immunitaire pourrait éviter une course à l'armement [129], une surenchère dans l'agression, sélectionnant de plus en plus des cellules tumorales capables de contrer ces agressions. Ces hypothèses offrent de nombreuses perspectives pour le développement de thérapies en l'abordant sous l'angle évolutif.

Cependant, une question demeure. Toujours dans l'hypothèse ou une mutation ou une différence d'expression génétique, se maintient dans le temps et fait émerger des profils génétiques bien connus et étudiés de nos jours, est-ce parce qu'elle a permis de faire évoluer l'environnement pour assurer la survie cellulaire ? Est-ce au contraire l'environnement qui a sélectionné, ou même activé des gènes spécifiques adaptés à ce milieu ? Cette dernière

[130]: YANG et al. (2014), « Niche Inheritance : A Cooperative Pathway to Enhance Cancer Cell Fitness Through Ecosystem Engineering »

[131]: ZHANG et al. (2017), « Integrating evolutionary dynamics into treatment of metastatic castrate-resistant prostate cancer »

[132]: THOMAS et al. (2017), « Cancer adaptations : Atavism, de novo selection, or something in between ? »

[133]: LLOYD et al. (2016), « Darwinian Dynamics of Intratumoral Heterogeneity : Not Solely Random Mutations but Also Variable Environmental Selection Forces »

[134]: VINCENT (2011), « Cancer : A de-repression of a default survival program common to all cells ? »

[135]: TRIGOS et al. (2018), « How the evolution of multicellularity set the stage for cancer »

[136]: SEGRETAIN et al. (2021), « Who Plays Complex Music ? On the Correlations Between Structural and Behavioral Complexity Measures in Sign Boolean Networks »

[137]: LIU et al. (2021), « A persistently low level of atmospheric oxygen in Earth's middle age »

[138]: DAVIES et al. (2011), « Cancer tumors as Metazoa 1.0 : tapping genes of ancient ancestors »

question posée par plusieurs évolutionnistes [132-134] réinscrit le cancer dans sa longue histoire.

2.3.2 Le cancer dans l'évolution

Lorsque la multicellularité a émergé, la mise en commun des ressources, la spécialisation cellulaire, l'apoptose et de nombreux autres processus ont permis l'accès à de nouvelles niches écologiques et d'augmenter la durée de vie et les stratégies de protections face aux aléas environnementaux et aux prédateurs (alors d'autres organismes unicellulaires). Cette multicellularité s'est construite cependant par-dessus le schéma unicellulaire existant [135]. Ici la notion d'extensibilité est importante. Comment l'ajout de fonctions par-dessus les fonctions antérieures peut-elle se faire sans risquer de mettre en péril la cohérence globale du fonctionnement cellulaire ? Cela se voit par exemple avec les cadres de lecture dans l'ADN, ajouter ou supprimer un nucléotide et l'ARN polymérase transcrit une séquence ARN différente. Cela peut également être étudié encore plus simplement avec des réseaux booléens. Comment construire un réseau exécutant une séquence d'instructions et capable d'extension sans perdre la fonction première ? Cette question est étudiée au sein de notre équipe en évaluant la relation entre structure de réseaux booléens à signes et la complexité des comportements qui en découle [136].

La sélection naturelle a permis d'acquérir de nouvelles fonctions sans pour autant éradiquer toutes les anciennes qui à la place ont été réprimées [132]. Avant la multicellularité et dans les phases antérieures du Précambrien la vie sur Terre était bien différente de ce quelle est aujourd'hui. Le taux d'oxygène dans l'atmosphère était bien plus bas (moins de 10% de son niveau actuel [137]) et l'environnement acide. Les cellules majoritairement glycolytiques, étaient adaptées pour favoriser la prolifération au sein de ces conditions hostiles. Conditions qui ressemblent fortement à celles présentes au sein des tumeurs actuelles.

Atavisme

Cette apparition de la multicellularité a donc construit blocs après blocs des couches fonctionnelles par-dessus les anciennes. L'atavisme est défini comme la réapparition d'un caractère latent provenant d'un ascendant. La théorie ataviste du cancer a été proposée en 2011 par Davies and Lineweaver [138]. Ils définissent l'hypothèse ataviste comme un retour à des capacités de survies phylogénétiques inscrites dans le patrimoine génétique de toutes cellules eucaryotes.

Dans le cancer, la cellule soumise à des facteurs de stress, un environnement proche de celui de la Terre à l'époque précambrienne ou fragilisée par des mutations, perdrait successivement la capacité d'utiliser certains gènes de la multicellularité (perte de la complexité associée) et ce faisant pourrait en réactiver d'anciens jusque-là réprimés pouvant potentiellement être plus adaptés à la situation dans laquelle la cellule se trouve. Dans cette théorie, le changement de phénotype ne résulte pas de l'acquisition de nouveaux comportements par une mutation mais de l'exécution d'un schéma cellulaire établi il y a plusieurs millions d'années. L'accès au génome "ancien" devient à nouveau possible. Cet accès était cadenassé par des couches inhibitrices (notamment via l'expression de gènes répresseurs) qui s'écroulent de façon séquentielle. Cela pourrait expliquer notamment pourquoi les signatures génétiques observées dans le cancer semblent converger entre tissus et individus.

Bien entendu, l'atavisme ne nie pas l'observation de mutations actuelles. Au contraire, une cellule du Précambrien fonctionne ainsi, favorise la prolifération cellulaire et le taux élevé de diversification du génotype qui l'accompagne. Mais dans ce cadre il est important de distinguer l'expression ataviste et les nouveaux changements qui s'ajoutent au-dessus.

Modélisation multi-échelle d'une tumeur

3

"Comment l'hétérogénéité métabolique tumorale peut-elle émerger?". Dans le chapitre 1 les concepts qui m'ont orientés vers cette question ont été décrits et j'ai formulé les questions qui en découlent : "L'hétérogénéité métabolique s'explique-t-elle nécessairement par une cause génétique (mutations)?" ; "L'hétérogénéité est-elle spatiale, temporelle, les deux?" ; "Cette hétérogénéité est-elle bénéfique pour la population tumorale?". Dans ce chapitre je vais m'attacher à présenter les types de modélisation mathématiques et computationnels qui me permettront de donner des éléments de réponse.

La modélisation d'une tumeur peut prendre énormément de formes différentes. Bien souvent c'est un ensemble de modèles qui est combiné pour répondre à une question spécifique. Ainsi, des modèles peuvent se centrer spécifiquement sur le comportement d'une cellule (au niveau génétique, métabolique, mécanique, etc.) ou au contraire s'attarder sur une population de cellules pour en étudier sa dynamique de croissance.

La ou les questions posées déterminent les dimensions à considérer : une quantité ? Une durée ou un instantané ? Une position dans l'espace ? Parfois cela peut même être l'ensemble au travers de dimensions d'ordre plus élevé. Enfin la complexité et le cout computationnel précisent la faisabilité du modèle. Parfois ce qui contraint le choix d'un ou plusieurs modèles plutôt qu'un autre peut dépendre du type et de la quantité de connaissances que l'on a à disposition. Cette connaissance peut-être de nature théorique (a priori sur la structure étudiée) ou concrète au travers de données (mesures de flux, de niveaux d'expressions de gènes).

Pour aborder l'hétérogénéité du métabolisme, j'ai choisi de constituer un modèle spatio-temporel en deux et trois dimensions spatiales d'une masse tumorale composée de milliers de cellules et son environnement. Le modèle est testé au cours d'un grand nombre de simulations visant à suivre l'évolution de la tumeur. Plus spécifiquement, cette masse sera un sphéroïde, modèle expérimental tumoral *in vitro* de référence dans la littérature [139] et étudié parallèlement par le développement de modèles computationnels dans notre équipe. Grâce à ce modèle il est possible de suivre dans le temps, une quantité très importante de cellules, d'observer l'évolution de leur phénotype et épigénome, de regarder leur distribution au sein du tissu, leur profil énergétique et l'impact des conditions environnementales.

3.1	Modèles mathématiques du métabolisme	46
3.1.1	Modèles stœchiométriques	46
3.1.2	Modèles cinétiques	48
3.2	Modèles computationnels	51
3.2.1	Modèles individus-centrés	52
3.3	Choix de référence expérimentale et de modèle hybride	54
3.4	Intégration des différentes échelles biologiques	62
3.4.1	Échelle environnementale	63
3.4.2	Échelle biochimique	66
3.4.3	Échelle génétique/épigénétique	75
3.4.4	Échelle cellulaire	77
3.4.5	Échelle tissulaire	78
3.4.6	Choix de programmation	80

[139]: ZANONI et al. (2016), « 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening : a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained »

En début de chapitre, je me focaliserai dans un premier temps sur la description des modèles mathématiques du métabolisme et ensuite sur leur intégration au sein de modèles computationnels.

Les modèles mathématiques décrivent un système ainsi que ses observations en utilisant des formalismes et concepts fondés sur des équations, souvent des équations différentielles ordinaires (EDO) ou des équations aux dérivées partielles (EDP). Les modèles computationnels quant à eux peuvent intégrer l'implémentation numérique de modèles mathématiques mais se rapportent principalement à l'ensemble des instructions algorithmiques n'étant pas formulé mathématiquement.

Enfin, je préciserai mes choix pour la constitution du modèle dont les résultats seront analysés au chapitre 4.

3.1 Modèles mathématiques du métabolisme

[140]: BEURTON-AIMAR et al. (2013), « Metabolic Network Reconstruction and Their Topological Analysis »

[141]: KĘDZIA et al. (2018), « Simulation of multicellular populations with Petri nets and genome scale intracellular networks »

[142]: ORTH et al. (2010), « What is flux balance analysis? »

Dans cette section seront décrites, les approches mathématiques pour décrire les réactions biochimiques du métabolisme. Il s'agit seulement d'une petite partie de la grande variété de modèles mathématiques appliqués au vivant mais c'est celle qui aborde les problématiques de cette thèse. On peut citer notamment les modèles topologiques qui étudient par l'étude de graphes la structure du réseau métabolique [140] ou les réseaux de Petri [141] qui permettent de s'intéresser aux transitions d'états.

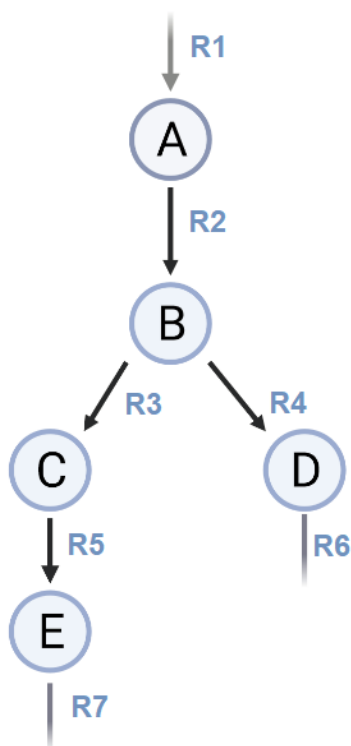


FIGURE 3.1 – Exemple d'un set de réactions biochimiques.

3.1.1 Modèles stœchiométriques

La modélisation par contrainte et notamment les Flux Balance Analysis (FBA) [142] ont gagné en popularité lorsque les séquençages du génome ont permis de construire des cartes du métabolisme de plus en plus précises. Cette méthode se base sur deux postulats : le système étudié est dans un état stationnaire et il est optimisé pour un but précis (croissance, production d'ATP, économie d'énergie...).

Exemple 3.1.1 L'ensemble des flux réactionnels R_i de la figure 3.1, impliquant m métabolites permet de créer une matrice stœchiométrique S de taille $(m * r)$:

$$S = \begin{matrix} & R1 & R2 & R3 & R4 & R5 & R6 & R7 \\ A & \left(\begin{array}{ccccccc} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 \end{array} \right) \end{matrix} \quad (3.1)$$

et le vecteur de valeurs de flux \vec{v} :

$$\vec{v} = \begin{pmatrix} v_A \\ v_B \\ v_C \\ v_D \\ v_E \end{pmatrix} \quad (3.2)$$

Il faut donc trouver les valeurs de \vec{v} tel que $S * \vec{v} = \vec{0}$ et $\vec{v} \geq 0$. Il faut ensuite réduire l'ensemble des solutions avec des contraintes définissant l'objectif auquel répond le système (par exemple maximiser la production de E) et des bornes connues ou supposées ($0 \leq R2 \leq 5$ si l'on sait par exemple que la réaction 2 ne peut pas être supérieure à 5 mmol/min). Cela définit idéalement au moins une solution qui répond à ces contraintes.

L'avantage de cette méthode est qu'elle est simple à réaliser et demande peu de connaissances des paramètres biochimiques du système. Elle a montré son efficacité dans la prédiction de vitesse de croissance de *E.coli* [143] et est couramment utilisée en biotechnologie pour optimiser les concentrations des milieux de cultures. Son faible coût en calcul l'a rendue très attractive pour proposer des modèles à l'échelle du métabolome humain entier [144] et l'utiliser pour tester l'effet de médicaments notamment vis-à-vis du cancer.

Cependant, elle a de multiples inconvénients. La FBA est statique puisqu'elle ne prend pas en compte tous les mécanismes de cinétiques chimiques et de régulations. Elle ne donne aucune dynamique temporelle des métabolites. Une solution partielle est employée, celle de coupler la méthode avec des équations différentielles qui actualisent les paramètres d'entrées de la FBA à chaque itération (dynamic Flux Balance Analysis : dFBA) [145]. Le plus gros problème c'est qu'elle part du principe que le système dans son ensemble est dans un état stationnaire ce qui n'est pas le cas en permanence au sein d'une cellule et notamment dans des cas comme le cancer.

Les modèles stœchiométriques, ne sont pas exclusivement générés grâce aux (d)FBA, bien que cette méthode soit la plus répandue, il existe de nombreuses méthodes dérivées et extensions comme

[143]: HARCOTTE et al. (2013), « The Ability of Flux Balance Analysis to Predict Evolution of Central Metabolism Scales with the Initial Distance to the Optimum »

[144]: ANGIONE (2019), « Human Systems Biology and Metabolic Modeling : A Review—From Disease Metabolism to Precision Medicine »

[145]: MAHADEVAN et al. (2002), « Dynamic Flux Balance Analysis of Diauxic Growth in Escherichia coli »

[146]: GUDMUNDSSON et al. (2010), « Computationally efficient flux variability analysis »

la FVA. La FVA (Flux Variability Analysis) permet de définir les bornes pour chaque flux permettant d'atteindre la solution optimale (c'est-à-dire la plus proche de l'objectif) [146]. Un flux dont la variabilité est faible est susceptible d'être plus important que les autres flux au regard de l'objectif fixé.

3.1.2 Modèles cinétiques

Les modèles cinétiques (*Kinetic models* en anglais), permettent de décrire l'évolution des concentrations de métabolites et les flux associés au cours du temps grâce à des équations différentielles ordinaires (EDO) :

Exemple 3.1.2 En reprenant les flux de la figure 3.1.

$$\begin{aligned}\frac{dA}{dt} &= f(t, A, B) \\ &= R1 - R2 \\ \frac{dB}{dt} &= f(t, B) \\ &= R2 - R3 - R4\end{aligned}$$

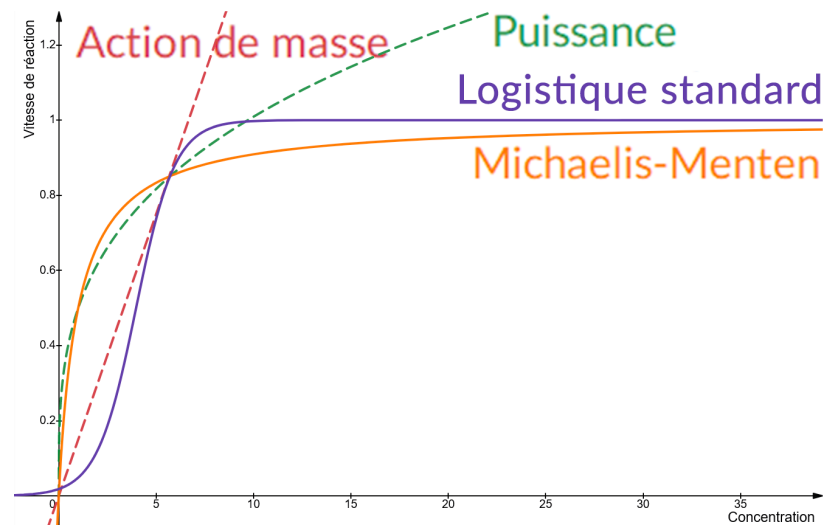


FIGURE 3.2 – Vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat pour différentes lois enzymatiques. En rouge la loi d'action de masse, en vert la loi de puissance en violet la loi logistique standard (forme sigmoïde) et en orange la loi de Michaelis-Menten

Ces équations se basent souvent sur le mode d'action de, ou des enzyme(s) catalysant la réaction. La figure 3.2 décrit la vitesse d'une réaction élémentaire à un instant t , en fonction de la concentration en substrat. Les quatre lois présentées, décrivent toutes des comportements différents plus ou moins proches de la réalité.

Definition 3.1.1 Description mathématique des lois couramment utilisées en cinétique enzymatique.

Loi d'action de masse :

$$\frac{dX_i}{dt} = k_i \cdot \prod_{j=1}^n X_j$$

avec X concentration du substrat, ij les indices des métabolites impliqués, k_i la constante d'affinité de l'enzyme pour le substrat et n le nombre de substrats.

Loi de puissance (réaction réversible) :

$$\frac{dX_i}{dt} = \alpha_i \prod_{j=1}^m X_j^{p_{ij}} - \beta_i \prod_{j=1}^n X_j^{p_{ij}}$$

avec α_i, β_i taux de production et de consommation du substrat et p_{ij} ordre cinétique de la réaction (> 0 lorsque j augmente la production de i , < 0 quand il l'inhibe et $= 0$ lorsqu'il n'y a aucun effet direct).

Équation de Michaelis-Menten (monosubstrat) :

$$\frac{dX}{dt} = \frac{V_{max} \cdot X}{K_M + X}$$

avec V_{max} vitesse maximum de la réaction (saturation) et K_M constante de Michaelis (concentration de X pour laquelle la vitesse réactionnelle est égale à la moitié de sa vitesse maximale).

Équation de Hill (généralisation de Michaelis-Menten monosubstrat à la coopération enzymatique) :

$$\frac{dX}{dt} = \frac{X^p}{k + X^p}$$

avec k constante apparente de dissociation dérivée de la loi d'action de masse et p coefficient de Hill qui quantifie le degré d'interaction entre les sites de fixations des ligands.

Loi logistique standard (monosubstrat) :

$$\frac{dX}{dt} = \frac{V_{max}}{1 + e^{-k \cdot (X - K_m)}}$$

avec V_{max} vitesse maximum de la réaction (saturation), K_M constante de Michaelis et k paramètre définissant la raideur de la pente.

La loi *d'action de masse* est utilisée pour décrire des réactions peu complexes, pour lesquelles il manque des informations sur leurs régulations ou pour garder sciemment un système d'équations le plus simple possible. Concrètement, la vitesse réactionnelle est proportionnelle au produit des concentrations en substrat. À l'équilibre, le ratio entre substrats et produits est constant.

[147]: SAVAGEAU et al. (1987), « Biochemical systems theory and metabolic control theory : 1. fundamental similarities and differences »

La loi de puissance est une extension de la loi d'action de masse et a été notamment proposée au sein d'un framework proposé par Savageau et al. [147] nommé "Biochemical Systems Theory". L'objectif était de structurer l'écriture des réactions biochimiques et de proposer un modèle polyvalent et simple mathématiquement. Les formules intègrent des ordres cinétiques définis par l'intensité de l'effet d'un métabolite intervenant dans la réaction. Un des désavantages de cette méthode cependant c'est qu'elle nécessite souvent de prendre des paramètres empiriques pour représenter les données expérimentales (mesure de concentration au cours du temps par exemple). De plus, de par sa nature, la courbe ne possède pas de "plateau" c'est-à-dire, un point d'inflexion saturant. Lorsque toutes les enzymes d'un milieu réactionnel sont mobilisées dans des réactions, il n'en reste plus de disponibles entraînant une saturation de la vitesse de réaction par rapport à la concentration. La loi de puissance peut convenir dans une certaine mesure pour décrire une réaction saturante tant que la gamme de concentration en substrat utilisée est adaptée aux paramètres de la loi choisie.

[148]: SCHNELL (2013), « Validity of the Michaelis-Menten equation - steady-state or reactant stationary assumption : that is the question »

L'équation de Michaelis-Menten elle, décrit très bien cette saturation. C'est la loi utilisée classiquement pour décrire des réactions enzymatiques monosubstrats. Elle est fondée sur deux postulats qui sont celui d'état quasi stationnaire de la réaction (la variation de la concentration en complexe enzymatique ne varie que très peu en comparaison du substrat et du produit) et celui d'une concentration constante au cours du temps de la concentration totale en enzyme [148]. L'équation nécessite de connaître (ou d'estimer) la constante de Michaelis K_m et la vitesse maximum de la réaction.

L'équation de Hill peut-être vue comme une version étendue de l'équation de Michaelis-Menten incluant des mécanismes de régulation et de coopérativité.

La loi logistique est sans doute la moins utilisée vis-à-vis des réactions biochimiques mais a l'avantage d'être symétrique au point milieu de sa pente et permet de modéliser aisément des mécanismes de régulation entraînant l'activation ou l'inactivation de réactions (par exemple provoquées par le pH).

Ces équations ont généralement de nombreuses versions dérivées adaptées aux réactions réversibles, à plusieurs substrats, etc. La principale difficulté qu'elles engendrent comparativement aux modèles stoechiométriques est la quantité de paramètres à fixer. La seconde difficulté émerge lorsque le nombre d'équations du système à résoudre devient important. Il peut arriver qu'il y ait un mélange d'équations linéaires et non-linéaires ce qui rend la résolution complexe et lente pour les solveurs numériques. Enfin, les équations sont valables si l'on ne s'éloigne pas trop de l'état stationnaire du système. Pourquoi s'imposer de telles contraintes? L'utilisation d'équations différentielles est la seule méthode permettant d'adresser le temps et d'étudier l'évolution des composés au cours du temps. Lorsque cela est possible elle permet d'intégrer des résultats expérimentaux.

Les équations présentées étant déterministes elles ne représentent pas toujours la réalité soumise aux fluctuations [149]. Elles peuvent alors devenir stochastiques en intégrant de l'aléatoire et des petites perturbations [149]. Cela permet à la fois d'éprouver la robustesse du réseau métabolique modélisé et de définir une probabilité d'être dans un état à un instant t .

[149]: JHA et al. (2012), « Exploring behaviors of stochastic differential equation models of biological systems using change of measures »

3.2 Modèles computationnels

L'objectif des modèles de la section précédente était d'obtenir des valeurs associées au métabolisme (valeur de flux, de concentrations). Pour connecter ces modèles il faut les intégrer dans un contexte. Les réactions métaboliques ont lieu au sein d'une cellule qui possède une température, un pH, une pression, un volume défini. Cette cellule, elle-même, se déplace, absorbe et sécrète des éléments dans l'environnement, grossit, se divise. Tous ces éléments sont des points sensibles se répercutant sur la cinétique des réactions (la température par exemple peut modifier la thermodynamique réactionnelle). Beaucoup de modèles étudiant le cancer via des modèles mathématiques continus exclusivement ont comme désavantage de ne pas pouvoir individualiser les cellules. Ces modèles décrivent des populations ou des sous-groupes ayant les mêmes caractéristiques. Intégrer tous les comportements cellulaires deviendrait infaisable et trop complexe.

Les modèles computationnels avec leurs approches discrètes, peuvent le faire plus simplement. Les modèles computationnels sont traduits en programmes utilisant des algorithmes pour étudier des systèmes complexes (souvent non-linéaires) pour lesquels des solutions analytiques seraient difficilement envisageables. La résolution numérique du modèle, l'expérimentation itérative et

[150]: BARDINI et al. (2017), « Multi-level and hybrid modelling approaches for systems biology »

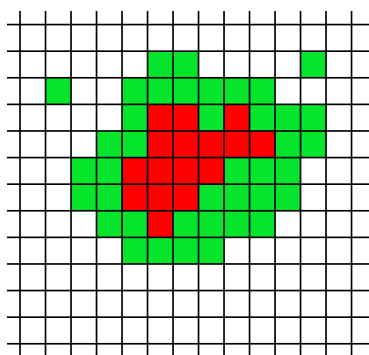


FIGURE 3.3 – Automate cellulaire

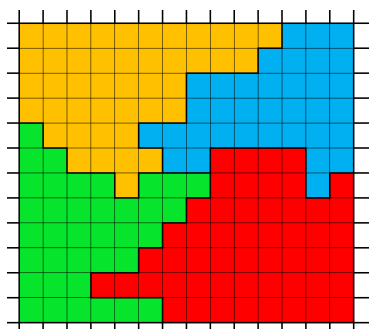


FIGURE 3.4 – Modèle cellulaire de Potts

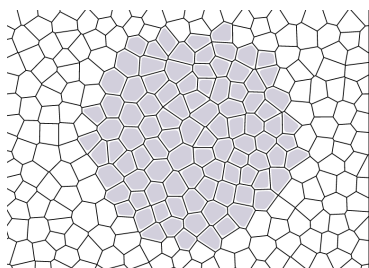


FIGURE 3.5 – Modèle basé sur les sommets

l'ajustement d'un grand nombre de paramètres remplacent l'absence de solutions analytiques. En couplant chacun de ces aspects, ces modèles permettent d'explorer des processus multiéchelles et d'explorer des comportements plus complexes au détriment d'une augmentation du temps et de la puissance de calcul.

Ceux qui m'intéresseront le plus par la suite sont les modèles dit hybrides [150] qui sont une combinaison de formalismes discrets (les modèles individus-centrés) et continus (modèles mathématiques - équations différentielles). Dans la section suivante nous allons donc voir que sont ces modèles individus-centrés et quels sont leurs avantages.

3.2.1 Modèles individus-centrés

Globalement on en distingue deux types[152], les modèles liés à une grille ("*Lattice-based agent*") et les modèles hors grilles ("*Off Lattice*" ou "*Lattice-free*"). Un individu est une entité modélisée définie par des comportements (une cellule, un agent, etc). Une simulation peut en contenir un nombre très grand chacun ayant son comportement propre. Une grille est une discrétisation de l'espace, régulière ou non et généralement décrite par des coordonnées cartésiennes : $\langle x, y \rangle$ en 2D et $\langle x, y, z \rangle$ en 3D. Dans ce cas chaque case de la grille est carrée mais il en existe d'autres avec par exemples des cases hexagonales.

L'avantage d'utiliser des individus avec leurs comportements propres réside dans la possibilité de renseigner des règles très simples individuellement pour voir émerger des comportements plus complexes au niveau de la population lorsque l'ensemble rentre en interaction. On peut donc à la fois observer chaque individu et la population ce que ne permet pas un modèle continu de population.

Individus sur grille

Automate cellulaire simple : Un automate cellulaire est classiquement modélisé sur une grille (ou maillage) rectangulaire (figure 3.3). Chaque case est définie par un état à un moment donné qui évolue le plus souvent en fonction des états des cases voisines [153]. Elles ont chacune un voisinage constitué de 4 cases (Von Neumann) ou 8 si l'on prend le voisinage de Moore (d'ordre 1). Le plus connu des automates cellulaires est le jeu de la vie ("*Game of life*") de John Horton Conway[154].

Modèle de Potts : Dans un automate cellulaire de Potts[155, 156], un individu se définit sur plusieurs cases tant que celles-ci sont adjacentes (figure 3.4). Ces modèles sont utilisés en particulier pour étudier la morphologie cellulaire et leurs processus migratoires. L'évolution au cours du temps d'une cellule de Potts tends à minimiser l'énergie mécanique (résultant de l'adhésion, répulsion, résistance au changement de volume) demandée par les différentes configurations cellulaires. Ces modèles ont été notamment utilisés pour étudier la morphogenèse et le développement des tissus[157, 158].

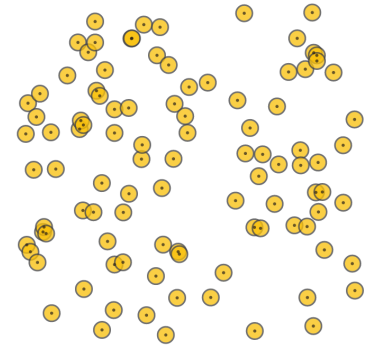


FIGURE 3.6 – Modèle basé sur les centres

Individus hors grille, approches multiagents

Modèles basés sur les sommets / tessellation de Voronoi : Les modèles basés sur les sommets ("Vertex models") ou les tessellations de Voronoi génèrent des polygones qui constituent un ensemble clos de cellules (figure 3.5). Ils permettent d'étudier plus finement les forces qui s'appliquent sur les parois cellulaires[152] et ressemblent beaucoup à la forme des cellules végétales. Le fait de ne pas être limité par une grille permet d'obtenir des formes plus intéressantes. De nombreux logiciels modernes de simulation de tissus, comme le logiciel *Chaste*[159] se servent de ce type de modèles.

Modèles basés sur les centres : Les modèles basés sur les centres [151, 160, 161] sont assez simples conceptuellement. Un agent est un point. Autour de ce point est dessiné une sphère de taille variable correspondant aux limites de l'agent (figure 3.6). On parle également d'"overlapping spheres" car il peut advenir que des agents soient suffisamment proches pour que leurs sphères se superposent. Dans ce cas, la force d'interaction entre les deux agents définit la direction qu'ils vont prendre. Si les agents sont trop proches, il y aura répulsion et à l'inverse trop loin, ils peuvent s'attirer.

L'avantage c'est que le centre qui définit l'agent est libre et uniquement soumis aux contraintes mécaniques qui peuvent émerger. Pas de grilles, pas besoin de voisins immédiats, mais également une forme géométrique très simpliste pour des cellules. L'intérêt pour la modélisation n'est néanmoins pas perdue, si la partie mécanique est approximée via les forces d'adhésions, attractions et répulsions. Pour un nombre de cellules suffisamment grand la dynamique tissulaire qui en résulte est suffisante comme le montre le logiciel *PhysiCell*[151] qui se base sur ce modèle (figure 3.7).

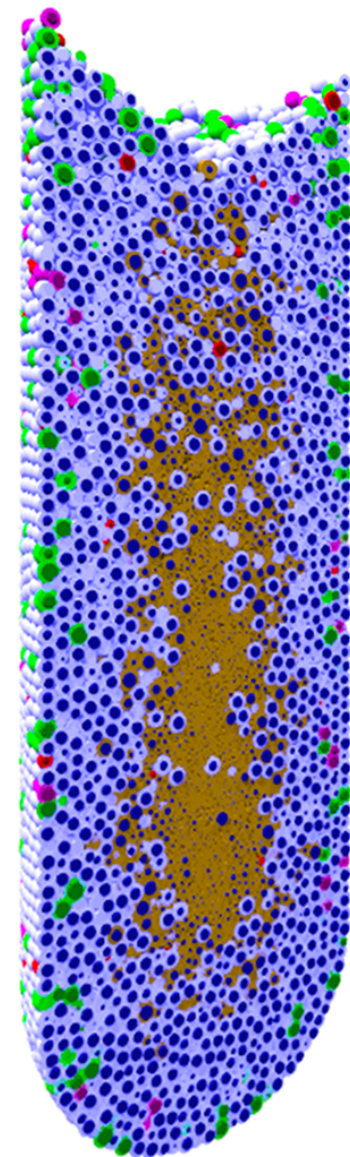


FIGURE 3.7 – Modèle CBM de carcinome canalaire généré avec PhysiCell [151]

3.3 Choix de référence expérimentale et de modèle hybride

FIGURE 3.8 – Sphéroïde observé par microscopie confocale. Ce sphéroïde d'environ $450\ \mu\text{m}$, a été obtenu à partir de cellules F98 (gliomes de rats). Les cellules ont ensuite été marquées avec une sonde fluorescente, le BCECF, qui permet de mesurer le pH cellulaire vu ensuite par fluorescence.

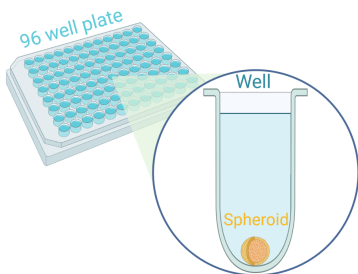
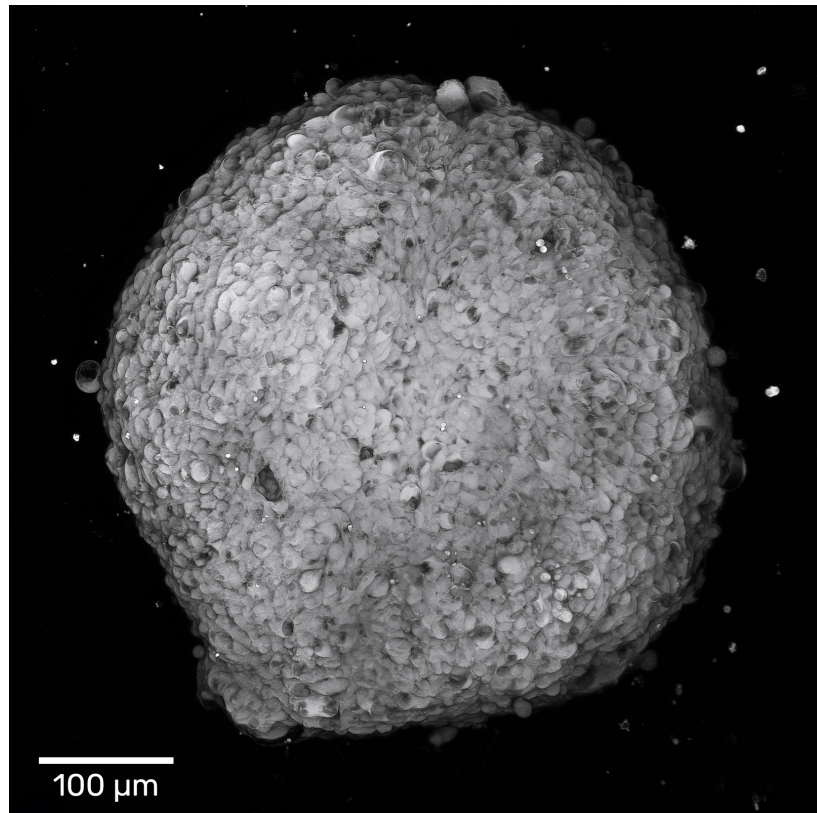


FIGURE 3.9 – Sphéroïde dans une plaque de 96 puits. Les sphéroïdes sont cultivés dans des plaques à fond transparent pour être observés par microscopie confocale sans les sortir de leur milieu de culture.

[162]: LARSEN (2018), « Sphéroïdes : le modèle de référence pour la culture *in vitro* des tumeurs solides ? »

Dans cette section, je vais décrire les différents choix qui m'ont permis de constituer un modèle du métabolisme tumoral et de le simuler.

J'ai pris comme référence expérimentale tissulaire, des sphéroïdes tumoraux. Ces sphéroïdes sont des modèles de référence pour la culture *in vitro* des tumeurs solides [162] car contrairement aux cultures 2D monocouches classiques, ils permettent d'étudier l'hétérogénéité tumorale et ont une organisation tissulaire avec une évolution de la densité bien plus importante qui génère de l'hypoxie ce qui les rend plus proches des conditions *in vivo*. Ces sphéroïdes sont étudiés au sein de notre équipe (figure 3.8) ce qui permet de comparer les résultats expérimentaux (morphologie, croissance, concentrations, pH) et de simulation afin d'affiner le modèle de manière itérative.

Ces sphéroïdes reposent dans des puits (figure 3.9) contenant du milieu de culture et notamment du glucose. Les puits sont maintenus à température (37°C) et pression de CO_2 constante (5%). L'objectif est donc de reproduire ces sphéroïdes et leur environnement.

Pour la partie mathématique, dans le chapitre 1, le modèle réalisé par *Li et al.* [84] a été rapidement évoqué. L'évolution de ma réflexion au cours de la thèse m'a conduit à réaliser plusieurs modèles puis à adopter et modifier le leur.

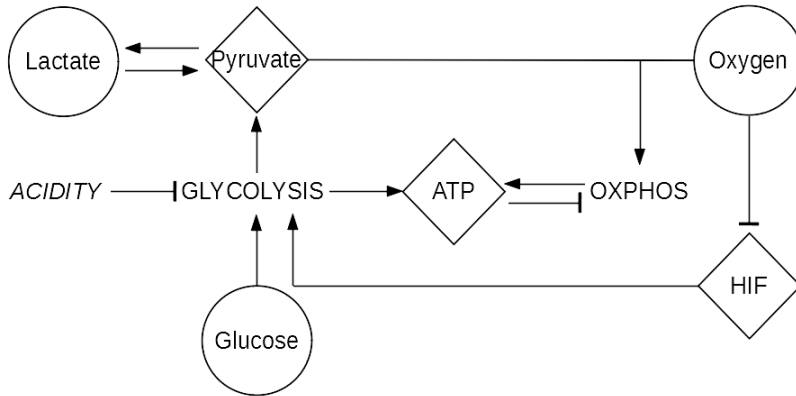


FIGURE 3.10 – Premier modèle réalisé

Le premier modèle que j'ai développé m'a permis de tester le rôle du pyruvate dans la répartition des flux vers la respiration ou la fermentation, préciser l'importance du lactate et d'inclure l'inhibition glycolytique par l'acidité, sur la base des récentes publications et données expérimentales [54] mettant en avant le rôle de l'acidité dans la régulation du métabolisme.

Ce modèle est peu complexe et facilement compréhensible. Dans ce modèle, si la glycolyse ne produit pas assez d'ATP (par manque de glucose ou par saturation des réactions) alors la cellule se met à consommer plus d'oxygène pour combler exactement l'ATP manquant. Le modèle répond aux observations suivantes :

1. La consommation de glucose augmente avec la concentration extracellulaire de glucose et la consommation d'oxygène augmente avec la concentration extracellulaire d'oxygène [163, 164]. La consommation de lactate augmente avec l'acidose lactique [165].
2. Moins il y a d'oxygène dans le milieu, plus le glucose est consommé [166] jusqu'à un certain seuil [163] (pour assurer le plus possible un état stationnaire dans la production d'ATP).
3. Plus le milieu est acide, moins il y a de glycolyse. *L'acidification du milieu décroît le pH intracellulaire entraînant une baisse de l'activité des enzymes glycolytiques. Cela entraîne une augmentation du glucose intracellulaire qui assez rapidement fait diminuer l'absorption du glucose extracellulaire* [54, 163] [167, 168].
4. La concentration de pyruvate reste quasi-constante [54]. *Cet état stationnaire est rendu possible par la régulation de sa production par la glycolyse, de sa consommation via la respiration, de son excrétion et de sa régénération par le lactate.*

[163]: CASCIARI et al. (1992), « Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH »

[164]: MUELLER-KLIESER et al. (1986), « Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids »

[165]: WU et al. (2016), « Lactic acidosis switches cancer cells from aerobic glycolysis back to dominant oxidative phosphorylation »

[166]: FULDA et al. (2007), « HIF-1-regulated glucose metabolism : A key to apoptosis resistance? »

[167]: DIETL et al. (2010), « Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes »

[168]: FELLEENZ et al. (1988), « Influence of Extracellular pH on Intracellular pH and Cell Energy Status : Relationship to Hyperthermic Sensitivity »

[169]: JACQUET et al. (2019), « A simplified model of cell metabolism to revisit the glycolysis-OXPHOS relationship in the deregulated tumor microenvironment »

L'article décrivant ce modèle "A simplified model of cell metabolism to revisit the glycolysis-OXPHOS relationship in the deregulated tumor microenvironment" [169] est disponible en annexe. Les résultats obtenus à partir de ce modèle ont montré, dans une optique de production d'ATP, qu'afin de garder un niveau de pyruvate constant il était nécessaire d'orienter les flux glycolytiques vers la fermentation lorsque celui-ci dépassait l'activité maximum du complexe pyruvate déshydrogénase. À l'inverse lorsque le flux glycolytique est réduit par l'acidité, il est nécessaire de consommer le lactate. Ainsi, l'activité oxydative est maintenue autant que le niveau d'oxygène le permet et transitionne progressivement vers la fermentation tant que l'acidité n'est pas trop importante, transition dictée par le maintien de la concentration de pyruvate.

Une version très imagée, permettrait de voir ce système comme un barrage hydroélectrique. Le barrage retient l'eau (pyruvate) provenant du fleuve (glycolyse). Le besoin en énergie (ATP) dicte l'ouverture du barrage en aval (oxphos) avec plus ou moins d'intensité. Parfois le niveau d'eau déborde, le barrage laissant alors passer le surplus (lactate) sans produire d'énergie. À l'inverse lorsque, le niveau d'eau est trop bas, une autre source est utilisée (lactate).

L'objectif premier de ce modèle inspiré de celui de Casciari et al. [78] se basant sur les imports et sécrétions cellulaires est de remettre en question la notion de switch métabolique en montrant la nécessité d'une transition continue entre états. Il a cependant un a priori assez fort. Tout est fait pour que la cellule produise un niveau d'ATP fixé en conservant son niveau de pyruvate (figure 3.10). C'est une hypothèse simplificatrice mais ce système n'est pas assez souple pour l'étendre à des questions plus larges sur l'hétérogénéité. Comment déterminer le niveau d'ATP nécessaire pour toutes les cellules? Est-ce qu'elles ont toutes les mêmes besoins? Est-ce que le métabolisme des cellules et particulièrement des tumeurs, est optimisé pour produire de l'ATP? Le modèle est trop contraint pour un système aussi simple.

J'ai changé de paradigme et réalisé un nouveau modèle (figure 3.11), plus détaillé. Ici aucun objectif à atteindre n'était assigné à la cellule et les équations écrites étaient seulement descriptives des réactions biochimiques. On retrouve néanmoins, les observations 1 et 3 du modèle précédent. L'observation 1 est directement liée à l'écriture de Michaelis-Menten du type :

Exemple 3.3.1 Consommation de glucose :

$$U_G = V_G^{max} \times \frac{[G]}{k_G + [G]} \quad (3.3)$$

avec $[G]$ le glucose extracellulaire, V_G^{max} vitesse maximum d'absorption de glucose et k_G constante de Michaelis.

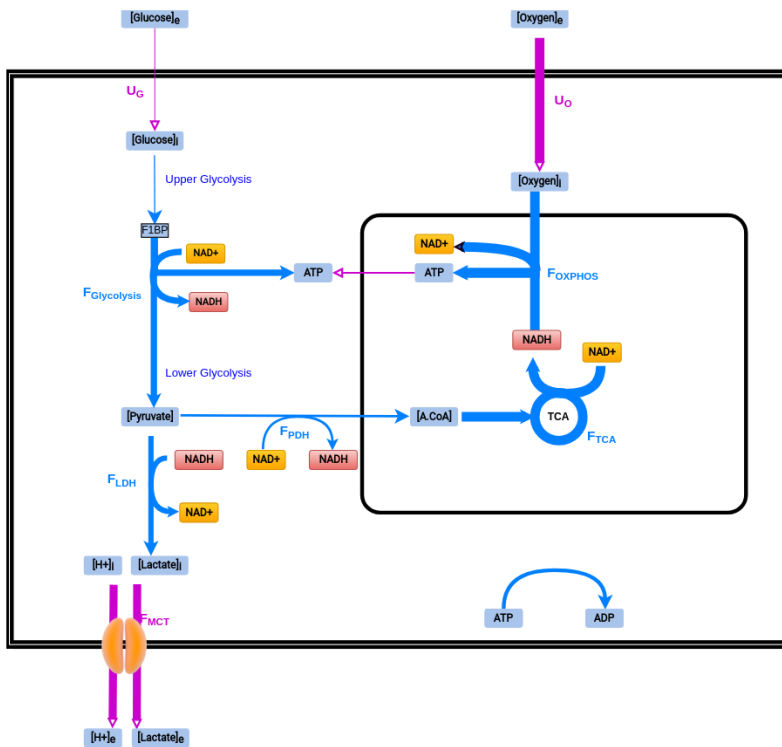


FIGURE 3.11 – Deuxième modèle réalisé

L'observation 3 (baisse de l'activité glycolytique en fonction du pH), est l'un des principaux objectifs de mes modèles car très peu pris en compte dans les modèles du métabolisme. Bien souvent ces modèles sont valables pour un pH donné (souvent neutre). Pourtant, le constat qu'un pH acide fait disparaître ou réduire, l'effet Warburg [54, 165] [170, 171] est critique et doit être pris en compte ce qui implique de modéliser l'activité des protons.

Il existe des modèles complexes, se focalisant sur la modélisation du pH intracellulaire [172, 173] mais qui ne sont pas réellement connectés avec le métabolisme énergétique des cellules. Je ne me suis donc focalisé uniquement sur la variation du pH due à la production d'acide lactique par fermentation en considérant les autres mécanismes cellulaires faisant intervenir le pH comme stables (en postulant que leurs variations sont négligeables vis-à-vis de la fermentation). Ce faisant un pH extracellulaire variable est obtenu.

Pour obtenir le pH intracellulaire, je me suis servi de profils de variation du pH intracellulaire par rapport au pH extracellulaire obtenus expérimentalement au sein de notre équipe (voir Annexes Section A.3). Le pH intracellulaire me permet alors de moduler la glycolyse en la rendant efficace qu'à seulement 10% lorsque qu'il est de 6.0 (valeur estimée à partir de [54]).

[170]: SHUVALOV et al. (2021), « Linking Metabolic Reprogramming, Plasticity and Tumor Progression »
 [171]: PRADO-GARCIA et al. (2020), « Lactic Acidosis in the Presence of Glucose Diminishes Warburg Effect in Lung Adenocarcinoma Cells »

[172]: HIREMATH et al. (2019), « Modeling of pH regulation in tumor cells : Direct interaction between proton-coupled lactate transporters and cancer-associated carbonic anhydrase »

[173]: PIASENTIN et al. (2020), « The control of acidity in tumor cells : a biophysical model »

Seulement, une fois toutes ces équations formalisées, j'ai fait face à de nombreux problèmes :

1. Les paramètres cinétiques sont difficiles à obtenir depuis la littérature ou dans les bases de données. Ce sont souvent des organismes, conditions expérimentales, méthodes de mesures et unités, différents.
2. Les 25 équations ne sont pas linéaires et difficiles à calculer pour les solvers ou à analyser pour les outils de calculs symboliques.
3. Le modèle dans son ensemble est difficile à calibrer. L'état stationnaire est quasi impossible à atteindre car nécessitant un ajustement très fin des paramètres et des valeurs aberrantes émergeaient souvent. J'ai tenté de multiples approches pour trouver des états stationnaires et redéfinir les paramètres, allant de l'analyse de sensibilité, à des algorithmes de minimisation (descentes de gradients, recuit simulé) en passant par du machine learning, sans succès.
4. Quand bien même, un état quasi stationnaire est atteint, le système est très sensible aux variations externes.

Il est possible de faire de la réduction de modèle c'est-à-dire de simplifier les équations en regroupant les termes et paramètres en des termes plus simples et plus compacts, conservant globalement les mêmes propriétés générales au détriment de leur sens biologique. Cette approche n'a pas été retenue car difficile à mettre en œuvre et le fait de créer trop de paramètres "abstraites" (c'est-à-dire s'éloignant d'une signification concrète biologique) semble en contradiction avec le modèle conçu, reposant sur un squelette biochimique bien établi et facilement décorticable.

Face à ces difficultés, la lecture de l'article "*Uncovering the Underlying Mechanisms of Cancer Metabolism through the Landscapes and Probability Flux Quantifications*" [84], publié dans *iScience* en 2020 quelques mois avant, a apporté certaines solutions. Dans cet article, les auteurs ont étendu et affiné le modèle de MARÍN-HERNÁNDEZ et al. [174] (qui se focalisait sur la glycolyse), en incluant les voies énergétiques mitochondriales, les concentrations de différentes enzymes, ainsi que la régulation d'une dizaine de gènes clés (figure 3.12).

[174]: MARÍN-HERNÁNDEZ et al. (2011), « Modeling cancer glycolysis »

L'objectif de ce modèle est de regarder l'interaction entre le réseau de régulation de gènes et l'expression métabolique. Ce modèle possède plus d'EDOs et est plus fin dans la description des réactions que mes modèles précédents, mais les EDOs en commun sont suffisamment proches pour garder la même philosophie de modélisation. Les paramètres sont eux basés sur des données expérimentales bien moins éparses que celles que j'ai pu sélectionner

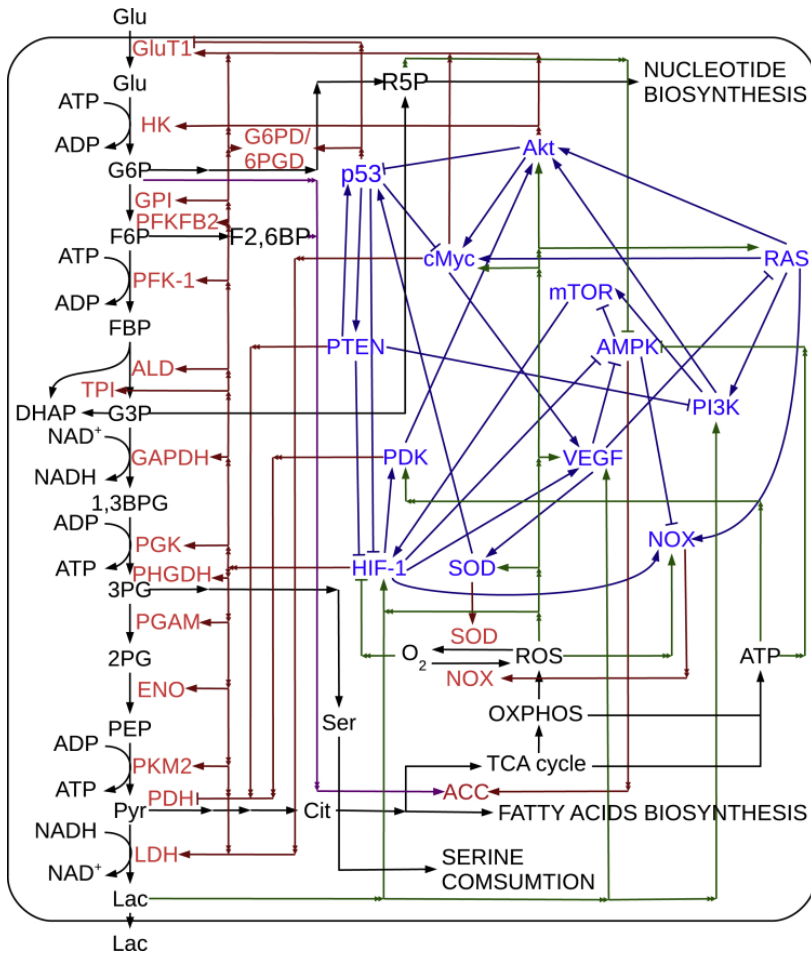


FIGURE 3.12 – Cancer Gene-Metabolism Integrative Network. Figure issue de [84]

et le système dans son ensemble est numériquement stable. Ils intègrent dans le système d'équations différentielles, des fluctuations et petites perturbations aléatoires inhérentes aux systèmes biologiques réels. Les équations deviennent stochastiques et au lieu d'évaluer l'évolution de la trajectoire des différentes variables (concentrations en oxygène, glucose, expression du gène p53, etc.), c'est l'évolution de leur distribution qui est considérée. Ils cartographient ensuite le "paysage" des états stationnaires et leur probabilité (revoir figure 1.10).

Du fait du grand nombre de variables qui en découle toutes les dimensions du système n'ont pas besoin d'être traitées en même temps car les auteurs ont fait le choix de regarder seulement le paysage formé par deux variables qui sont les concentrations en enzymes PDH (Pyruvate déshydrogénase) et LDH (lactate déshydrogénase). Ces deux enzymes sont en quelque sorte représentatives de la bifurcation entre les deux fameux "modes" métaboliques (fermentation et respiration).

Ce modèle ne répond cependant pas à toutes mes questions. Bien qu'il soit composé d'EDO, l'évolution temporelle des différentes configurations cellulaires n'a pas été adressée. On peut comprendre

la démarche, plutôt que de regarder l'évolution temporelle, la probabilité d'états via la topologie des attracteurs a été privilégiée. Ainsi c'est la dérivée à un instant t de chaque flux pour un grand nombre de conditions qui est évaluée. Cependant, la contrepartie c'est que cela ne donne qu'une image statique de ce paysage déconnectée du contexte de croissance tumorale. Ne faisant pas de suivi temporel, les valeurs extracellulaires n'ont pas besoin d'être actualisées dynamiquement et les unités des flux résultants ne sont pas homogènes. Le pH qui vient justement modéliser ce paysage au cours du temps n'est pas intégré. Enfin la répartition spatiale du métabolisme n'est pas abordé.

J'ai repris les équations de ce modèle en ajoutant différents aspects qui n'ont pas été abordés par les auteurs (pH, temporalité, spatialité) et en mettant à jour le modèle (code converti à partir de MATLAB, conversion des unités, ajustement des mécanismes de transport du lactate).

[175]: MIRAMS et al. (2013), « Chaste : An Open Source C++ Library for Computational Physiology and Biology »

Pour effectuer la simulation générale, qui encapsule le modèle mathématique, après avoir évalué les différents logiciels open-source de simulation cellulaire (comme *Chaste* [175], *CompuCell3D* [158], *Biocellion* [161], etc.), le logiciel *PhysiCell* [151] a été retenu. Celui-ci est écrit en C++, est structuré sous forme de modules facilement extensibles et relativement simple d'utilisation pour un programmeur. Il inclut déjà des exemples de simulations de sphéroïdes et une multitude de fonctions permettant de contrôler des cycles cellulaires, gérer la division des cellules, leur mort ou encore la diffusion de substrats dans le milieu de culture. On peut alterner entre des simulations en 2D ou en 3D.

La figure 3.13 montre les grands blocs structurels du modèle sous *PhysiCell*. On distingue trois niveaux :

1. L'environnement : Une grille servant uniquement à la diffusion des nutriments (ici de l'oxygène, du glucose, du lactate et des protons). Ce maillage permet à chaque pas de temps d'accéder pour chaque coordonnée (pixel en 2D ou voxel en 3D) à une concentration pour chacun des nutriments. La discrétisation du domaine de simulation permet d'utiliser des algorithmes rapides pour calculer la diffusion.
2. Le tissu : L'ensemble des agents (cellules), une liste stockant leurs positions au sein du domaine de simulation. La mécanique cellulaire (adhésion, répulsion, calcul de densité) y est calculée. Il y a peu de fonctions à ce niveau car l'objectif est de fonctionner au niveau le plus petit c'est-à-dire au niveau de chaque agent.

3. La cellule elle-même. Comme précisé plus haut, les cellules sont libres de se déplacer n'importe où dans le domaine et ne sont pas rattachées à une grille. Chaque cellule possède un type cellulaire, un cycle qui lui est propre, un volume, un système d'équation correspondant à son métabolisme et sa génétique avec ses paramètres spécifiques et ses propres concentrations.

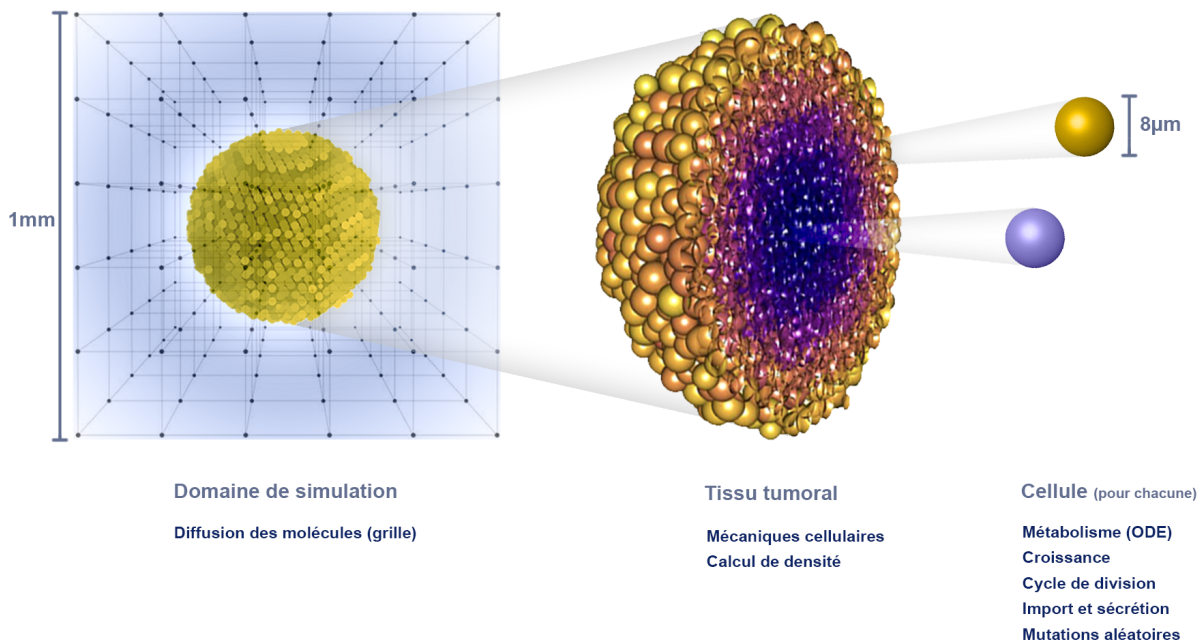


FIGURE 3.13 – Structure du modèle réalisé. Le domaine de simulation est discrétisé en une grille 3D dans laquelle sont calculées les diffusions de nutriments. Au-dessus se trouve un tissu tumoral constitué d'agents non rattachés à la grille incluant chacun des comportements spécifiques.

Il s'agit d'un modèle hybride[176] car il couple des formalismes discrets donnés par les différents algorithmes utilisés et développés dans PhysiCell, au formalisme continu du système interne cellulaire, qui utilise des EDOs et les EDPs décrivant la diffusion.

Le logiciel PhysiCell a, à l'heure actuel, un développement très actif et la communauté qui l'utilise est chaque jour plus grande. Il a cependant fallu à un moment donné choisir une version et implémenter de nombreuses fonctionnalités qui n'existaient pas alors ce qui a par la suite empêché de prendre en compte les nouvelles mises à jour du logiciel.

C'est en effectuant des centaines d'itérations du modèle, en regardant les résultats des simulations et en les comparant avec les données expérimentales que le besoin de ces fonctionnalités a émergé ce qui est suffisant pour justifier de s'y attarder dans la section suivante. C'est d'ailleurs cet exercice d'essais et d'erreurs qui a constitué la majeure partie de mes travaux.

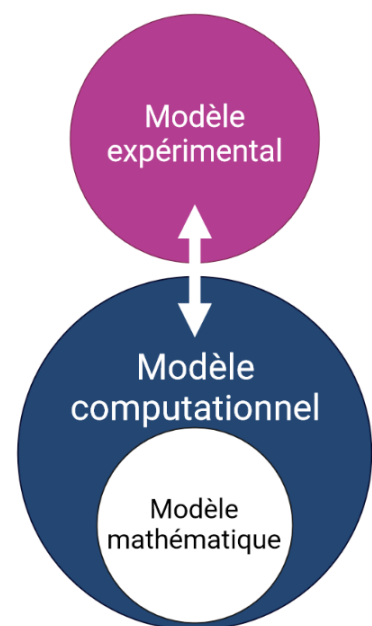


FIGURE 3.14 – Relation entre les différents types de modèles choisis.

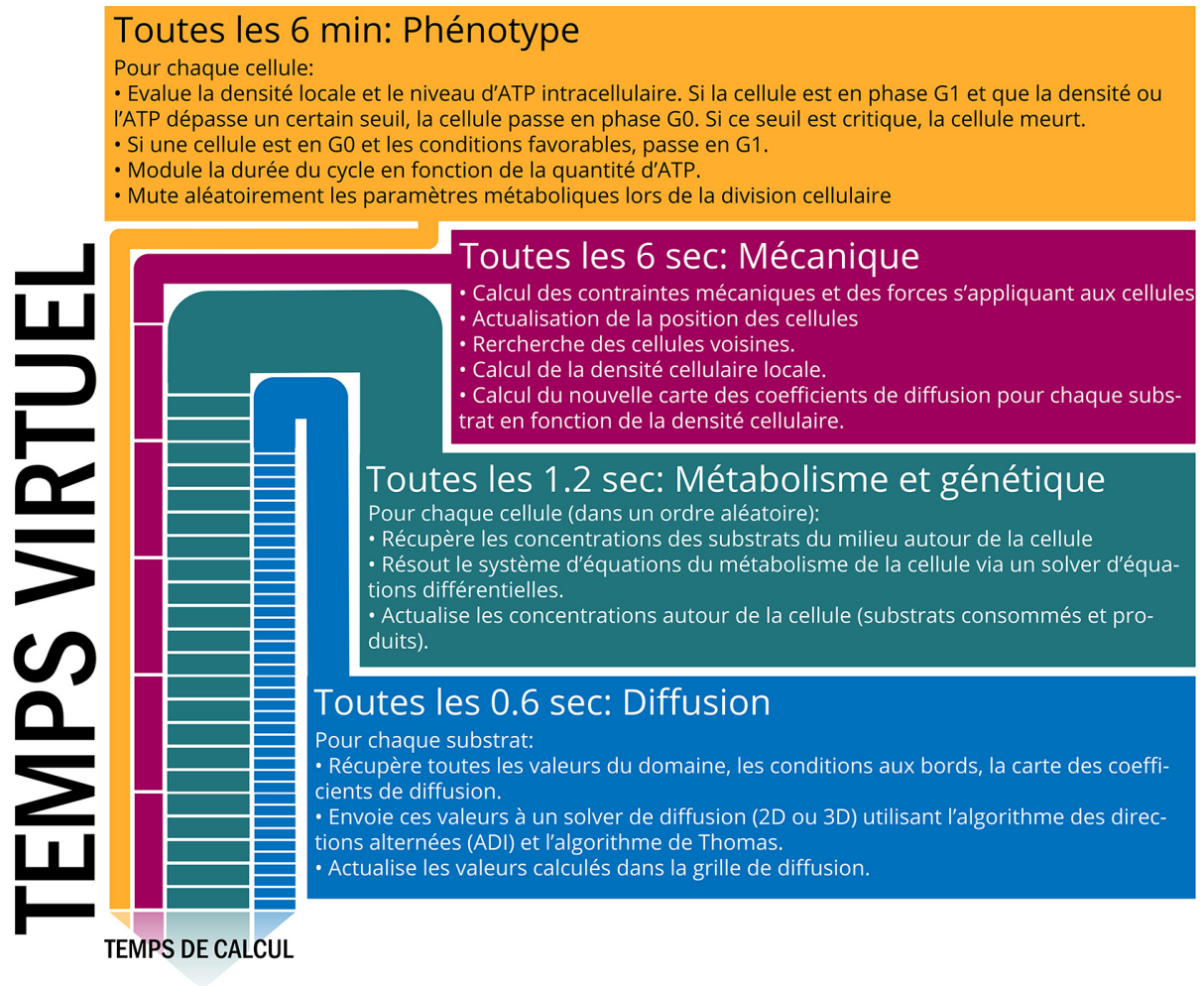


FIGURE 3.15 – Échelle de temps des différents éléments de la simulation. Chaque élément est évalué à une fréquence spécifique (temps virtuel), représentée par les traits entrecoupés. Plus les traits sont épais plus le temps (réel) de calcul nécessaire pour l'évaluer est important.

3.4 Intégration des différentes échelles biologiques

Le "découpage" principale de la simulation est spatiotemporelle. En effet, tous les processus modélisés ne se produisent pas aux mêmes échelles de temps, certains processus étant beaucoup plus rapides que d'autres. Une résolution temporelle différente pour chaque processus, permet de moduler l'impact relatif des fluctuations survenant au cours de processus très fréquents, sur des processus moins fréquents. Par exemple, le phénotype de chaque cellule n'est évalué que toutes les 6 minutes de temps virtuel alors que leur métabolisme est évalué toutes les 1.5 seconde. Dans le référentiel "métabolisme", le phénotype semble donc stable. Un autre point très important est l'économie en temps de calcul. Si tous les processus sont évalués à l'échelle de temps la plus petite, le temps de calcul serait trop important sans pour autant obtenir des résultats plus réalistes.

La figure 3.15 décrit les échelles de temps utilisées pour chaque processus biologiques modélisés. Le découpage temporel est de 0.6 seconde pour la diffusion, 1.2 seconde pour le métabolisme (résolution des équations différentielles = 2x la diffusion), 6 secondes pour la mécanique (10x la diffusion) et 6 minutes pour le phénotype (600x la diffusion).

Les unités choisies pour la simulation sont la minute (*min*) pour le temps, le micromètre (μm) pour la longueur donc (μm^2) pour les surfaces, (μm^3) pour les volumes et le millimolaire ($mM = mmol/L$) pour les concentrations. Il y a donc au sein du code, une conversion entre le μm^3 et le litre. J'ai choisi de conserver les deux unités de mesure de volume car la première est plus pratique pour calculer la diffusion des substrats tandis que la seconde est l'unité de volume classique pour les concentrations.

3.4.1 Échelle environnementale

L'environnement est ce qui est extérieur aux cellules. Concrètement, dans le cas du sphéroïde, il s'agit du milieu de culture contenant oxygène et nutriments. Ce milieu a également un pH qui peut évoluer. La figure 3.16 est un exemple de profil de concentration des différents substrats extracellulaires du modèle (oxygène, glucose, lactate et protons). Pour chaque substrat, les valeurs de concentration sont fixées aux bords du domaine (conditions de Dirichlet).

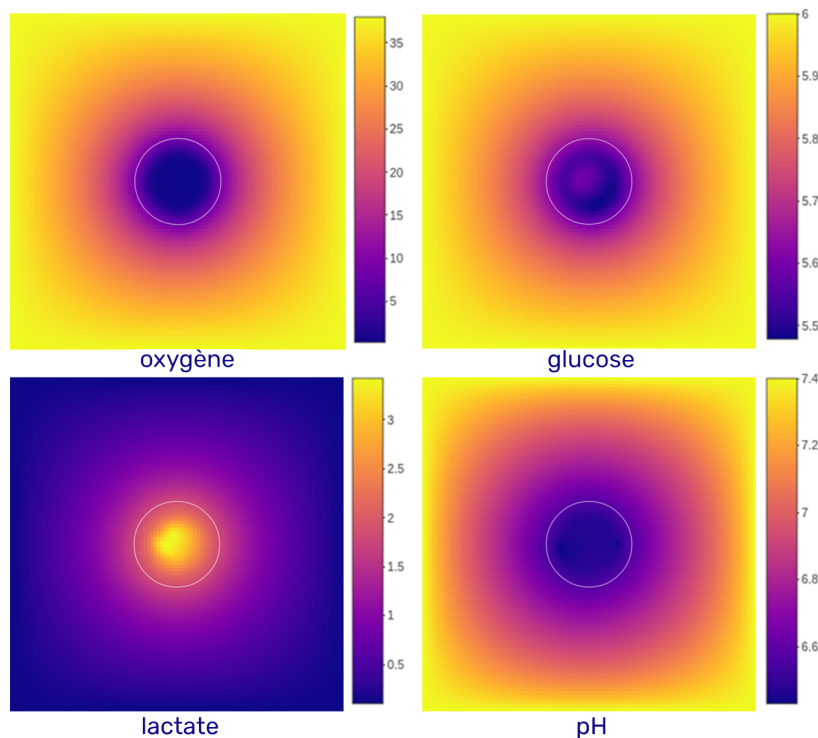


FIGURE 3.16 – Domaine de diffusion représenté par les 4 substrats extracellulaires présents. Le domaine de diffusion est une grille ou (maillage) cubique de $2000 \mu m$ de côté (divisé en 100 voxels de $20 \mu m$). Les cercles blancs représentent les contours du sphéroïde qui baigne dedans. Le gradient de couleur représente la concentration de chaque substrat. L'oxygène est exprimé ici en mmHg (millimètre de mercure car plus fréquemment utilisé dans la littérature) mais en mM dans le modèle. Le glucose et le lactate sont exprimés en mM et le pH sans unité (le pH est calculé à partir de la concentration en proton exprimée en mM aussi).

[177]: McKEOWN (2014), « Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumors—implications for treatment response »

[178]: VALABRÈGUE et al. (2003), « Relation between Cerebral Blood Flow and Metabolism Explained by a Model of Oxygen Exchange »

[179]: OTERO et al. (2021), « Oxygen Biosensors and Control in 3D Physiometric Experimental Models »

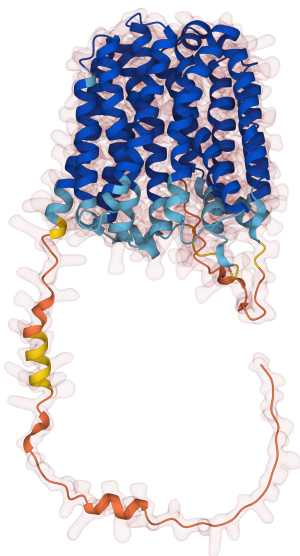


FIGURE 3.17 – Structure moléculaire d'un transporteur monocarboxylate 4 (MCT4). Image obtenue à partir de la base moléculaire Uniprot. (*UniProtKB - O15427*).

[180]: WILFRED D. STEIN (2014), « Channels, Carriers, and Pumps : An Introduction to Membrane Transport »

[181]: GARCIA-PÉREZ et al. (1999), « Molecular Crowding and Viscosity as Determinants of Translational Diffusion of Metabolites in Subcellular Organelles »

[182]: CUSSLER (2009), *Diffusion : Mass Transfer in Fluid Systems*

Substrats

- **Oxygène** : L'oxygène extracellulaire subit de nombreuses variations au sein des tumeurs. Accessible depuis les bords du domaine, l'oxygène est consommé en premier par les cellules de la périphérie du sphéroïde entraînant une déplétion au cœur du tissu. Le transport de l'oxygène à l'intérieur des cellules se fait par diffusion passive, la concentration intracellulaire s'équilibre donc avec la concentration extracellulaire. Les concentrations habituellement observées sont de 160 mmHg dans l'air à pression atmosphérique normale, 70 mmHg dans les artères, 38 mmHg en moyenne dans des tissus sains, le tissu est considéré en hypoxie en dessous de 15 mmHg et en hypoxie pathologique à 8 mmHg [177]. Les concentrations de départ choisies dans la simulation (converties en mM grâce au coefficient de Valabrègue 1.30×10^{-3} [178]) s'échelonnent entre 0 et 38 mmHg. Son coefficient de diffusion est de $87\,600 \mu\text{m}^2/\text{min}$ [179].
- **Glucose** : Le glucose extracellulaire est également amené depuis les bords du domaine et diffuse jusqu'au centre. Comme l'oxygène, les cellules du sphéroïde déplètent le glucose. Le transport au sein des cellules se fait par diffusion facilitée impliquant un transporteur GLUT. La concentration sanguine du glucose est proche de 5 mM ce qui est également la valeur maximum testée aux bords du domaine. Son coefficient de diffusion est de $30\,000 \mu\text{m}^2/\text{min}$ [180].
- **Lactate** : Le lactate est majoritairement, produit par les cellules et consommé dans une moindre mesure. Le lactate entre et sort des cellules via les MCT (monocarboxylate transporter figure 3.17) sous forme d'acide lactique. Pour une molécule de lactate sortante, un ion H^+ sort également. Aux bords du domaine la concentration est la plupart du temps fixée à zéro simulant ainsi une élimination continue par le réseau vasculaire ou dans le cas des sphéroïdes, le renouvellement du milieu. Dans certaines simulations les bords n'ont pas de valeurs fixées (conditions de Neumann) laissant le lactate produit s'accumuler. Son coefficient de diffusion est de $12\,600 \mu\text{m}^2/\text{min}$ [181].
- **H^+** : Les protons ont la même dynamique que le lactate. Ils entrent et sortent des cellules (dans mon modèle seulement via les MCT). Le pH résultant varie souvent de physiologique (~ 7.4) à très acide (~ 4.0). Le pH sur les bords du domaine est fixé à 7.4 et comme le lactate peut être remplacé dans certaines simulations par des conditions de Neumann. Son coefficient de diffusion est de $270\,000 \mu\text{m}^2/\text{min}$ [182].

Diffusion

L'algorithme pour résoudre les EDPs (Equations aux Dérivées Partielles) de diffusion (équation (3.4)), implémenté dans PhysiCell utilise la méthode LOD (locally one-dimensional), qui résout de manière séquentielle les EDPs sur chaque dimension (x,y,z) les unes après les autres.

Definition 3.4.1 Diffusion isotrope

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \nabla^2 C \quad (3.4)$$

avec C concentration en substrat et D coefficient de diffusion constant en tout point du domaine.

Pour chacune, les EDPs sont discrétisées spatialement par différences finies centrées d'ordre 2 et temporellement par différence régressive du premier ordre [151]. On obtient alors un système tridiagonal pour chacune des dimensions spatiales qui est résolu grâce à l'algorithme de Thomas.

Cette implémentation de la diffusion, avec un coefficient de diffusion D constant, est problématique. En effet, elle implique que, quel que soit le point de l'espace au sein du domaine, la vitesse de diffusion des substrats est identique. Dans ces conditions, une molécule de glucose, est déplacée aussi rapidement dans le milieu extracellulaire qu'au sein du tissu où la densité des cellules crée pourtant un maillage serré réduisant fortement la diffusion. En fonction de ce que l'on cherche à modéliser cela peut biaiser les gradients de substrats observés au sein des tissus. Dans les simulations avec diffusion isotrope, les gradients sont très peu marqués (la diffusion étant trop rapide au sein du tissu) et on ne voit pas les gradients de la figure 3.16.

La diffusion a donc été réécrite (équation (3.5)) avec un coefficient de diffusion $D(\rho)$ variable pour chaque coordonnée du domaine. D ici est dépendant de la densité locale ρ .

Definition 3.4.2 Diffusion anisotrope

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \nabla \cdot (D(\rho) \nabla C) \quad (3.5)$$

Pour chaque voxel, une densité est évaluée (en % d'occupation cellulaire du volume échantillonné). Si la densité locale est de 1 (100% du volume des voxels environnants est occupé) alors :

Proposition 3.4.1

$$D(\rho) = D_0 \cdot (1 - \alpha\rho) \quad (3.6)$$

avec D_0 coefficient de diffusion du substrat dans le liquide interstitiel, $\alpha \in [0,1]$ paramètre ajustant l'impact de la densité sur la diffusion, ρ la densité locale des cellules du voxel.

En utilisant $\alpha = 0.25$, les profils de diffusion obtenus ressemblent à ceux trouvés dans la littérature. Ce point sera réabordé (voir Section 3.4.5) un peu plus loin lors de la description des interactions mécaniques. La diffusion anisotrope, de par les termes qu'elle introduit, ne peut pas bénéficier des mêmes optimisations du code que l'isotrope. Le nouvel algorithme bien que parallélisé, perd donc en performance et introduit des conditions de stabilité lorsque le domaine simulé est en 3D, imposant un choix de pas de temps de diffusion plus petit, de sorte que :

Definition 3.4.3 Condition de stabilité de la diffusion anisotrope en 3D

$$dt < dt_{max}$$

$$dt_{max} = 3 \cdot \frac{dx^2}{2 \cdot D_0}$$

avec dt le pas de temps de diffusion et dx la longueur d'un voxel.

3.4.2 Échelle biochimique

Comme décrit dans la section précédente, le modèle biochimique du métabolisme reprend et modifie celui de *Li et al.* [84]. Le modèle original est écrit en code MATLAB. Il a été traduit en code symbolique en Python ce qui sert à générer directement le code C++ du système d'équation ainsi que la matrice jacobienne associée, directement dans PhysiCell.

EDO

Les équations différentielles décrivent les flux réactionnels mono- ou bidirectionnels et reprennent la forme suivante [183] qui est une forme étendue d'une équation de Michaelis-Menten, réversible et extensible à plusieurs substrats $[S]$ ou plusieurs produits $[P]$:

[183]: SEGEL (1975), *Enzyme kinetics : behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems* / Irwin H. Segel.

Definition 3.4.4 Flux d'une réaction réversible monosubstrat

$$v_{net} = \frac{V_{maxf} \cdot \frac{[S]}{K_{ms}} - V_{maxr} \cdot \frac{[P]}{K_{mp}}}{1 + \frac{[S]}{K_{ms}} + \frac{[P]}{K_{mp}}} \quad (3.7)$$

ici V_{maxf} et V_{maxr} sont respectivement, les vitesses maximum de la réaction dans le sens direct (forward) et inverse (backward). K_{ms} et K_{mp} sont les constantes de Michaelis du substrat et du produit.

Chaque cellule au sein de la simulation intègre l'ensemble du système d'équations correspondant à son métabolisme avec ses paramètres, ses concentrations propres. Au début de la simulation les quelques cellules de départ possèdent des concentrations internes pour chaque métabolites légèrement différentes (autour des valeurs de la littérature). À chaque pas de temps ($dt_{EDO} = 1.2\text{sec}$), l'ensemble des cellules est pris, dans un ordre aléatoire et pour chacune son système d'EDO est résolu avec le solver Rosenbrock d'ordre 4, de la librairie C++ Boost Odeint [184] que j'ai intégré dans PhysiCell.

Toutes les équations sont disponibles en annexe à la fin de ce document. Étant pour la plupart très proches de celles du code de *Li. et al* (table 3.1), je vais m'attacher à décrire les changements que j'ai effectués.

[184]: [AHNERT et al. \(2011\)](#), « Odeint - Solving Ordinary Differential Equations in C++ »

TABLE 3.1 – Réactions métaboliques intégrées dans le modèle. Les réactions vertes sont des réactions qui ont subies des changements mineurs par rapport au modèle de base, en orange des modifications majeures.

IDs	Enzymes	Réactions
r1	GluT1	Gluout \rightleftharpoons Gluin
r2	HK	Gluin + ATP \rightleftharpoons G6P + ADP
r3	GPI	G6P \rightleftharpoons F6P
r4	PFK-1	F6P + ATP \rightleftharpoons FBP + ADP
r5	ALD	FBP \rightleftharpoons DHAP + G3P
r6	TPI	DHAP \rightleftharpoons G3P
r7	GAPDH	G3P + NAD ⁺ \rightleftharpoons 1,3BPG + NADH
r8	PGK	1,3BPG + ADP \rightleftharpoons 3PG + ATP
r9	PGAM	3PG \rightleftharpoons 2PG
r10	ENO	2PG \rightleftharpoons PEP
r11	PKM2	PEP + ADP \rightleftharpoons Pyruvate + ATP
r12	LDH	Pyruvate + NADH \rightleftharpoons Lactate + NAD ⁺
r13	G6PD	6PGD G6P \rightleftharpoons R5P
r14	ATPases	ATP \longrightarrow ADP
r15	AK	AMP + ATP \rightleftharpoons 2ADP

r16	PFKFB2	3 F6P \rightleftharpoons F2,6BP
r17	PHGDH	3PG \rightarrow Serine
r18	PDH	Pyruvate + ADP \rightarrow Citrate + ATP + Complex2
r19	ACC	Complex2 + 3ATP + AC-CoA \rightarrow mal-CoA + 3ADP + NAD+
r20	SOD	ROS \rightarrow Null
r21		Lactate + H^+ \rightleftharpoons Lactate _{extra} + H^+
r22		3R5P \rightleftharpoons 2F6P + G3P
r23	NUCLEOTIDE BIOSYNTHE-SIS	R5P \rightarrow Null
r24	SERINE CONSUMPTION	Serine \rightarrow Null
r25	GPDH	NADH + ADP \rightarrow Complex2 + ATP + NAD+
r26		Citrate + 3ADP \rightarrow 3ATP + 4Complex2
r27		Complex2 + 1.5ADP \rightarrow 1.5ATP
r28		Complex2 \rightarrow ROS
r29	NOX	null \rightarrow ROS
r30		Citrate \rightarrow Null

Pour la plupart des réactions de la fermentation (en vert dans le 3.1), les expressions ont été multipliées par un terme $pH_{inhibition}$ qui diminue l'activité des enzymes lorsque le pH devient acide. Les enzymes choisies (et leur réaction associée) sont HK, GPI, PFK-1, ALD, TPI, GAPDH, ENO, LDH, G6PD-6PGD, PFKB2/3. Celles-ci correspondent aux enzymes dont le pH a affecté leur activité dans l'étude menée par Xie et al. [54]. Sur la base de leurs observations le terme $pH_{inhibition}$ a été ajouté :

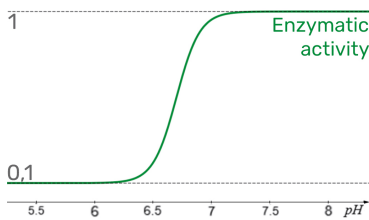


FIGURE 3.18 – Évolution de l'activité enzymatique relative par rapport au pH. Équation obtenue en utilisant l'équation (3.8)

Proposition 3.4.2 Terme d'inhibition par le pH

$$pH_{inhibition} = \alpha + \frac{1 - \alpha}{1 + e^{\left(\frac{pH_{mid} - pH_e}{\beta}\right)}} \quad (3.8)$$

avec α , le taux minimum d'activité enzymatique à pH acide (fixé à partir de [54] à 0.1= 10%), β paramétrant la sensibilité de la régulation (fixé à 0.12) et pH_{mid} le pH auquel l'enzyme fonctionne à 50% de son activité maximale (fixé à 6.7).

L'ajout de ce terme permet d'intégrer les observations récentes, de réduction de l'effet Warburg lorsque celui-ci a entraîné l'acidification du milieu. Ce simple ajout est source d'hétérogénéité au

sein de la tumeur notamment vis-à-vis des gradients d'exposition à l'acidité.

Dans le modèle original, l'oxygène est considéré comme un paramètre avec une valeur fixe (qui n'évolue pas contrairement aux variables) et n'a pas de répercussions directes sur l'OXPPOS. Le manque d'oxygène accroît la production de HIF, ce qui déclenche une série de réponses hypoxiques mais la chaîne respiratoire fonctionne normalement, tant que suffisamment d'unités de complexe II de la chaîne ont été formés. Ce n'est pas réaliste car il faut tout de même un accepteur final d'électrons, qu'est l'oxygène. C'est pourquoi les deux expressions génératrices d'ATP (r18 et r25), faisant intervenir le complexe II (dans le modèle initial), sont multipliées par un terme de Michaelis-Menten qui réduit fortement les réactions en dessous d'un seuil hypoxique [177] (0.011 mM O_2).

Proposition 3.4.3 Terme d'inhibition par l'oxygène

$$O_{2\text{inhibition}} = \frac{O_2}{O_2 + 0.011} \quad (3.9)$$

Comme ici, on se situe dans une situation où l'oxygène évolue de manière importante (de par la diffusion mais également à cause de la consommation des cellules) et que l'on s'intéresse à la trajectoire du système au cours du temps, l'oxygène n'est plus un simple paramètre mais une variable. Ainsi, il a fallu calculer la quantité d'oxygène consommée à partir de l'activité de la chaîne respiratoire, c'est-à-dire combien elle produit d'ATP. La modélisation du métabolisme mitochondrial est également un exercice complexe et impose un nombre d'équations très conséquent si l'on souhaite intégrer chaque mécanisme mis en jeu.

Le modèle de Li et al. [84] intègre les mécanismes minimum pour modéliser les flux qui nous intéressent au prix d'un découpage des réactions pas forcément très intuitif :

Pour produire de l'ATP dans la mitochondrie, le $NADH$ et le $FADH_2$ sont oxydés chacun mais ne produisent pas la même quantité de protons dans l'espace intermembranaire. Le $NADH$ en produit un peu plus ce qui permet *in fine* de faire fonctionner l'ATPase et produire un peu plus d'ATP (2.5 ATP environ pour le $NADH$ et 1.5 ATP pour le $FADH_2$). Dans le modèle le $FADH_2$ n'est pas modélisé, les auteurs établissent donc, dans une première réaction (r25), le compte de l'ATP excédentaire produit par $NADH$ (vis-à-vis du $FADH_2$, c'est-à-dire 1, une molécule d'ATP) créant alors l'unité mitochondriale "complexe II". Et, dans un second temps, ils calculent (r27) la quantité restante d'ATP (= 1.5) produite communément par $NADH$ et $FADH_2$. Ce découpage évite d'avoir à intégrer une variable supplémentaire et simplifie le nombre

d'équations à résoudre au détriment de la facilité de lecture des équations et de manipulation des résultats.

On estime actuellement, qu'en moyenne (encore une fois cela dépend de beaucoup de conditions) pour 12.5 ATP générés dans la mitochondrie à partir d'une molécule de pyruvate, 80% provient du $NADH$ (10 ATP) et 20% de $FADH_2$ (1.5 ATP). Si l'on ramène ce calcul au nombre de complexe II formés, on a donc : $1.5 \text{ ATP}_{FADH_2} \cdot 0.2 + 2.5 \text{ ATP}_{NADH} \cdot 0.8 = 2.3 \text{ ATP/complexe II}$ dans la chaîne de transport des électrons.

De plus, la quantité d'oxygène consommée lors du passage du complexe II au complexe IV, dépend également de la proportion de $NADH$ et $FADH_2$ utilisée. Avec $NADH$, le ratio ATP/oxygène (P/O ratio : ATP formé par molécule d'oxygène consommée) est de 5, contre 3 pour le $FADH_2$. On a donc 1 ATP pour $1/5 O_2$ avec le $NADH$ et 1 ATP pour $1/3 O_2$ avec le $FADH_2$. En gardant la même proportion que précédemment $NADH/FADH_2$, on a donc : $0.8 \times \frac{1}{5} + 0.2 \times \frac{1}{3} = 0.226 O_2/ATP$.

La formule finale de l'oxygène consommé se résume donc ainsi :

$$\frac{dO_2}{dt} = Q_{O_2/ATP} \cdot Q_{ATP/complexeII} \cdot \text{Flux}_{\text{ComplexeII} \rightarrow \text{IV}}$$

C'est-à-dire :

Proposition 3.4.4 *Oxygène au cours du temps*

$$\frac{dO_2}{dt} = 0.226 \times 2.3 \times r_{27} \quad (3.10)$$

Flux entrants et sortants de la cellule

Le transport de lactate entre la cellule et l'environnement a été révisé pour intégrer le transport de protons. Dans le modèle initial, celui-ci ne dépend que du gradient de concentration de lactate intra/extra-cellulaire. Or, les transporteurs monocarboxylates (MCT1 & MCT4 ici) fonctionnent étroitement avec la dynamique des protons [185]. Le transport ne dépend donc pas seulement du gradient de lactate mais également des protons, de sorte que la dynamique finale résulte d'une sorte d'équilibre entre les deux. La modélisation de ces transporteurs est complexe.

L'équation de transport a été composée en listant les différentes observations expérimentales [54] auxquelles elle devait répondre :

- Quel que soit le pH, le ratio des concentrations intracellulaires lactate/pyruvate est supérieur à 10 environ.

[185]: MORRIS et al. (2008), « Overview of the Proton-coupled MCT (SLC16A) Family of Transporters : Characterization, Function and Role in the Transport of the Drug of Abuse γ -Hydroxybutyric Acid »

- La concentration en pyruvate est maintenue relativement constante et demeure supérieure à 0.1 mM.
- Lorsque le pH extracellulaire est acide et que la concentration extracellulaire en lactate est plus élevée que l'intracellulaire ou que le ratio lactate/pyruvate descend trop bas, le lactate est transporté dans la cellule.
- Lorsque le pH extracellulaire est neutre et même si la concentration extracellulaire en lactate est plus élevée que l'intracellulaire, le lactate ne rentre que très peu dans la cellule.

Biologiquement, on distingue MCT1 et MCT4 vis-à-vis de leur thermodynamique, l'un et l'autre permettant plus facilement le transport dans l'un des deux sens. Pour simplifier le processus et éviter d'avoir à quantifier le nombre de transporteurs de chaque type, je ne modélise qu'un seul transporteur générique répondant à la dynamique globale :

Proposition 3.4.5 Flux de lactate et protons

$$r_{21} = V_m f_{21} \cdot (r_{21_{forward}} - r_{21_{reverse}})$$

Proposition 3.4.6 Transport sortant de lactate et proton

$$r_{21_{forward}} = \frac{1}{e^{2 \cdot (\text{Lactate}_{out} - \text{Lactate})} + 1} \cdot \frac{\text{Lactate}}{\text{Lactate} + 0.01} \cdot \text{Regulation}_{lac/pyr}$$

avec Lactate_{out} la concentration de lactate extracellulaire et Lactate , intracellulaire.

Le premier terme de $r_{21_{forward}}$, permet de diminuer le flux sortant lorsque la concentration de lactate extracellulaire est proche ou supérieure à l'intracellulaire et à l'inverse de l'amener à 1 lorsque $\text{Lactate} > \text{Lactate}_{out}$. Le second terme annule le premier lorsque le lactate intracellulaire est proche de zéro (pour ne pas sortir artificiellement du lactate qui n'existe pas).

Le dernier terme gère la dynamique entre le lactate et le pyruvate et se traduit par :

Proposition 3.4.7 Régulation du rapport entre lactate et pyruvate

$$\text{Regulation}_{lac/pyr} = \frac{1}{1 + \frac{1}{\left(e^{\text{Ratio}_{lac/pyr} - 10}\right)^2}} \cdot \frac{1}{e^{150 \cdot (0.1 - \text{Pyruvate})} + 1}$$

avec

$$\text{Ratio}_{lac/pyr} = \frac{\text{Lactate} + 0.001}{\text{Pyruvate} + 0.001}$$

Le ratio lactate/pyruvate ($Ratio_{lac/pyr}$) est calculé en ajoutant des termes très petits de 0.001 (vis-à-vis des concentrations standards) afin de ne pas avoir de valeurs critiques, si la concentration en pyruvate devient nulle. Le premier terme de $Regulation_{lac/pyr}$ permet de faire varier le flux sortant de lactate intracellulaire de 1 (lorsque le ratio est supérieur à 10) à 0 lorsque le ratio descend en dessous. Le second terme permet d'augmenter le flux sortant de lactate intracellulaire de 0 à 1, lorsque la concentration de pyruvate est supérieure à 0.1 mM, ceci afin de conserver le lactate à l'intérieur de la cellule si le pyruvate se raréfiait. La valeur de 150 est une valeur arbitraire permettant de régler la raideur de la courbe pour que le flux augmente rapidement. Cette valeur ne peut cependant pas être trop élevée afin de ne pas créer des transitions trop abruptes difficiles à résoudre pour les solveurs numériques.

Il est à noter dans ces dernières équations la présence de coefficients qui n'ont pas été mis sous forme de paramètres pour faciliter la lecture en raison du grand nombre de paramètres déjà présents dans le système. De plus, ces valeurs sont considérées constantes, une fois qu'elles ont été fixées (comme le 150 par exemple). Également, les équations peuvent être écrites dans une forme plus compacte mais non retenue dans ce document afin de conserver le sens des choix de modélisation et faciliter leur explication. Dans le code ces équations sont simplifiées automatiquement en utilisant un logiciel de calcul symbolique (SymPy [186]).

[186]: MEURER et al. (2017), « SymPy : symbolic computing in Python »

Proposition 3.4.8 Transport entrant de lactate et protons

$$r_{21reverse} = 0.2 \cdot \left(1 - \frac{1}{e^{2 \cdot (\text{Lactate}_{out} - \text{Lactate})} + 1} \right) \cdot \frac{\text{Lactate}_{out}}{\text{Lactate}_{out} + 0.1} \cdot Regulation_{pH_e/pH_i}$$

Le premier terme du transport entrant, est une constante fixée ici à 0.2 et qui est liée à la vitesse maximum des flux entrants par les transporteurs MCT. Si la valeur maximum de flux sortant est de 1, le flux entrant maximum n'est que 20% aussi efficace dans les expériences de Xie et al. [54]. Encore une fois ce paramètre pourrait être ajusté mais il n'a pas été nécessaire ici de le faire de manière dynamique. Le second terme est la contrepartie du premier terme de l'équation du flux sortant. Il est soustrait à 1 afin d'augmenter le flux entrant lorsque la concentration de lactate extracellulaire est proche ou supérieure à l'intracellulaire et à l'inverse de l'amener à 0 lorsque $\text{Lactate} > \text{Lactate}_{out}$. Le troisième terme annule le second lorsque le lactate extracellulaire approche de 0 afin de ne pas transporter du lactate à l'intérieur alors que celui-ci n'est pas présent. Le dernier terme $Regulation_{pH_e/pH_i}$ est défini par :

Proposition 3.4.9 Régulation du transport entrant de lactate et protons par le pH

$$\text{Regulation}_{pH_e/pH_i} = 1 - \frac{1}{e^{-2 \cdot \left(pH_e - \frac{pH_i}{pH_{eq}} \right)} + 1}$$

Ce dernier terme variant entre 0 et 1, favorise (le terme approche de 1) le transport entrant de lactate et protons lorsque la différence entre pH_e et pH_i pondérée par pH_{eq} est positive. Typiquement la valeur de pH_{eq} est de 1.1 ce qui permet un équilibre pour un pH extracellulaire légèrement plus acide que l'intracellulaire.

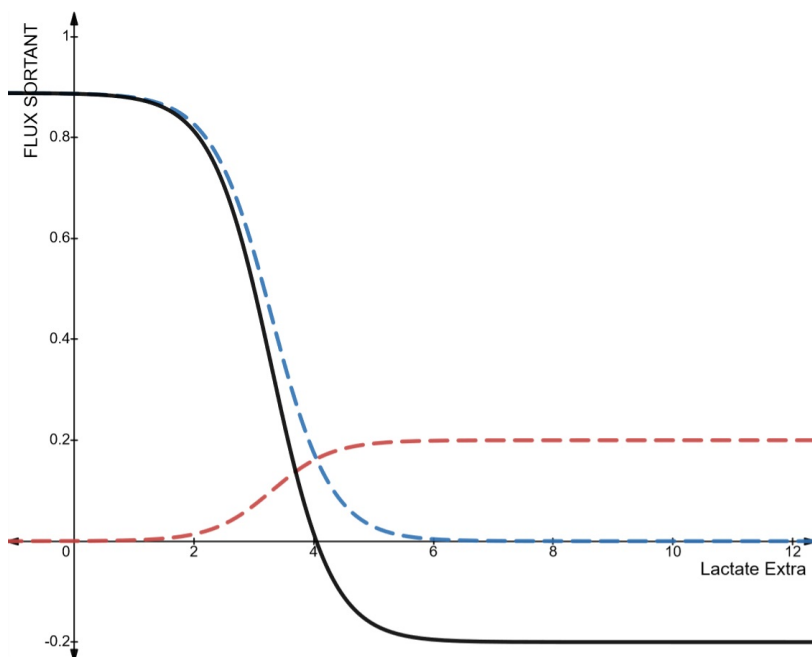


FIGURE 3.19 – Flux entrant et sortant de lactate et de protons en fonction de la concentration extracellulaire de lactate. En bleu, le flux sortant, en rouge le flux entrant (valeurs absolues) et en noir le flux résultant (r21). Dans cette figure la concentration en pyruvate est de 0.11 mM, lactate intracellulaire à 3.3 mM, le pH extracellulaire à 6 et le pH intracellulaire à 6.7 et $V_{mf_{21}}=1$

La figure 3.19, montre le résultat de la modélisation de r21 pour $V_{mf_{21}}=1$. On peut noter par exemple que le flux final en noir est légèrement en dessous de sa vitesse maximum de 1 lorsque le lactate extracellulaire est proche de 0 car le pyruvate est très proche de sa concentration minimum et que le ratio lactate/pyruvate n'est pas suffisamment grand pour compenser. Le transport est donc important par manque de lactate à l'extérieur mais pas maximum pour éviter de dépler tout le pyruvate. Le pH étant suffisamment acide, le flux entrant (en rouge) tend vers sa vitesse maximum de 0.2.

Pour calculer les concentrations des différents métabolites il ne reste plus qu'à additionner les flux entrants et sortants correspondants (3.1). Par exemple pour le glucose intracellulaire :

Proposition 3.4.10 *Concentration en Glucose intracellulaire au cours du temps*

$$\frac{d\text{Glucose}}{dt} = r_1 - r_2$$

Pour les protons, les seuls flux ayant un impact sont ceux du transport de lactate (r_{21}). Comme précisé plus haut, pour une molécule de lactate excrétée ou intégrée, un proton l'accompagne. On aurait donc tendance à penser que :

$$\frac{d\text{Lactate}_{\text{out}}}{dt} = \frac{dH_{\text{out}}^+}{dt}$$

En réalité, ce n'est pas vraiment le cas à cause du phénomène de buffering (effet tampon d'une solution). Lorsqu'une petite quantité de proton est ajoutée à une solution, celle-ci est capable de résister à un changement de pH si proche d'un équilibre entre acides faibles et leurs bases conjuguées. Le pouvoir tampon (ou *buffer capacity* en anglais) est une mesure de cette résistance et est spécifique de chaque type de solution. L'équation de Van Slyke [187] permet de calculer correctement l'évolution du pH d'une solution en fonction du pH existant et de la quantité de protons ajoutés (via r_{21}). La forme suivante découle directement de l'application de l'équation de Van Slyke :

[187]: URBANSKY et al. (2000), « Understanding, Deriving, and Computing Buffer Capacity »

Proposition 3.4.11 *Évolution de la concentration des ions H^+ extracellulaires au cours du temps*

$$\frac{dH_{\text{out}}^+}{dt} = \frac{r_{21}}{1000 \cdot \left(-\frac{Ka_{lac} \cdot \text{Lactate}_{\text{out}}}{1000 \cdot (H_{\text{out}}^+ + Ka_{lac})^2} + 1 + \frac{Ka_{water}}{(H_{\text{out}}^+)^2} \right)}$$

avec $Ka_{lac} = 10^{-3.86}$ mole/L, constante de dissociation du lactate et $Ka_{water} = 10^{-14}$ mole/L, constante de dissociation de l'eau. Les constantes de 1000 présentes permettent de convertir les molaires en millimolaires.

Une note sur l'implémentation dans PhysiCell. Lorsque plusieurs cellules se trouvent au même endroit (au-dessus du même voxel), elles lisent les mêmes concentrations à un instant t et tentent de transporter les mêmes flux. Dans le cas où il n'y aurait pas assez de nutriments pour toutes les cellules du voxel, le risque c'est que les concentrations deviennent négatives localement, c'est-à-dire que les cellules aient ingéré plus de nutriments que disponibles à un instant t . Pour éviter cela, un système de "dette de voxel" a été intégré, qui au lieu de transférer la matière entre les cellules et le voxel d'un seul coup, étale cette quantité jusqu'au prochain

pas de temps auquel est évalué le métabolisme. Les simulations engendrées ne sont pas différentes des simulations pour lesquelles un pas de temps plus petit aurait été pris.

3.4.3 Échelle génétique/épigénétique

Dans la section précédente, les équations définissant les flux métaboliques ont été définies. Au sein de ces équations certaines sont directement influencées par le niveau d'expression de différents gènes (par exemple le transporteur de glucose GLUT1 dans la réaction r1). Elles peuvent être également influencées indirectement par d'autres gènes qui agissent en amont (par exemple HIF accroît la production de GLUT1 qui à son tour agit sur r1). Le modèle de Li et al. [84] intègre ainsi 13 gènes agissant étroitement avec les enzymes et les métabolites du modèle. Pour étudier la dynamique de l'expression de ces derniers, leur niveau est normalisé à un niveau relatif de 1.

Definition 3.4.5 Évolution du niveau d'expression d'un gène au cours du temps

$$\frac{dX}{dt} = A \cdot H(Y) - D \cdot X$$

Le niveau d'expression de chaque gène X augmente à taux basal A de 0.005/min (niveau normalisé/min) et est dégradé à la même vitesse D . Ces valeurs sont calibrées sur des mesures effectuées dans des études précédentes et précisées dans leur publication. $H(Y)$ est une fonction de Hill définissant la régulation du gène Y sur le gène X :

$$H(Y) = \frac{S^n}{S^n + Y^n} + \gamma \cdot \frac{Y^n}{S^n + Y^n}$$

γ définissant le type de régulation (positive > 1 , négative < 1 et neutre $=1$), S le niveau de gène Y auquel l'expression est de moitié (similaire au K_m d'un Michaelis Menten) et n la force de régulation (entre 0,025 et 40).

L'ensemble de ces équations sont également définies en annexe. Aucune modification particulière n'a été apportée sur ces équations elles-mêmes mis à part sur celle de HIF qui est curieusement dégradé à taux constant dans la publication original et à taux variable en fonction de l'oxygène dans une des versions du code qui accompagne la publication. HIF étant bien entendu dégradé par l'oxygène, j'ai ajouté le terme $H(O_2)$ au terme de dégradation d'HIF dans mon modèle.

Régulation de l'expression des gènes

La manière dont les équations de régulation génétique sont présentées peut sembler très statique. En effet, ici à conditions extérieures équivalentes les cellules vont produire des niveaux d'expression équivalents. Ce qui définit principalement le comportement et la régulation de ces gènes est le paramètre de force de régulation γ . Plus le γ d'un couple gène-gène, gène-enzyme ou métabolite-gène est proche d'une valeur normalisée de 1, plus l'effet du premier membre de ce couple sur l'autre membre sera relativement faible et inversement plus il s'en éloigne plus elle sera forte. Li et al. se servent de ce paramètre en le fixant à une valeur aléatoire. Ils observent ainsi avec un grand nombre de tirages, l'influence du gène sur le paysage métabolique et principalement comment les attracteurs s'étendent ou rétrécissent.

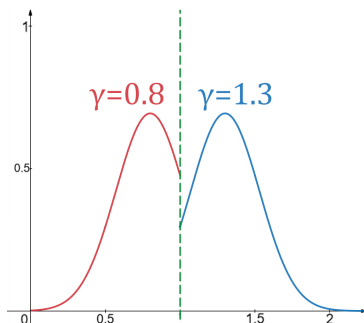


FIGURE 3.20 – Exemple de tirage de nouvelles valeurs de gamma. Les courbes, en bleu (pour un γ amplificateur) et rouge (pour un γ inhibiteur) décrivent la distribution de probabilité utilisée pour choisir la nouvelle valeur de γ à la division de la cellule. Elles sont tronquées au niveau de $\gamma = 1$ et 0 pour ne pas changer la fonction du gène.

Cette approche n'a pas été adoptée pour plusieurs raisons. La première est que l'objectif est de produire un modèle avec une temporalité. De ce fait la variation génétique ne vient pas intrinsèquement du nombre de cellules (nombre de tirages) mais de leur trajectoire dans le temps. C'est l'évolution du phénotype qui fait émerger l'hétérogénéité. La deuxième raison provient du biais que cela engendrerait. Si à un instant t , un profil génétique aléatoire est imposé, il sera observé sans distinction des profils viables et non viables sans pour autant savoir si celui observé a des chances d'exister. On en revient au concept d'atteignabilité décrit dans le chapitre 2.

Ainsi, les cellules au début de simulation sont initiées avec des valeurs de γ proches les unes des autres et des valeurs calibrées de la littérature. Lorsqu'une cellule se divise, pour chaque γ de chaque gène de son système, de nouvelles valeurs aléatoires sont tirées en suivant une loi normale centrée sur les valeurs actuelles de γ (en conservant le mode d'action, c'est-à-dire que si le gène a une action inhibitrice la valeur aléatoire ne sera pas tirée au-dessus de 1 - figure 3.20). Les nouvelles valeurs ont donc plus de chances de peu changer, mais de gros bouleversement peuvent ponctuellement survenir. Ce que cela permet, c'est d'effectuer une dérive progressive de l'épigénome de chaque cellule. Il est ici question d'épigénome et non pas de génome, car ce ne sont techniquement pas des mutations (dans la simulation) mais plus des variations de l'expression (qui biologiquement peuvent trouver leur origine par des vraies mutations, des signaux cellulaires, etc). De plus si la nouvelle configuration n'est pas viable la cellule finira à terme par mourir et la propagation de ces nouveaux γ sera limitée. Ainsi, si une cellule se trouve être dans un état à un instant précis, cet état est émergent et n'aura pas été imposé fortement à la cellule.

3.4.4 Échelle cellulaire

Cycle cellulaire - division - asynchronicité

Chaque cellule de la simulation possède un cycle, évalué à chaque $dt_{\text{phenotype}}$ qui détermine ce qu'elle fait ou ne peut pas faire. Le cycle cellulaire est calibré sur des cellules U87 de glioblastomes humains qui ont une durée de cycle approximative entre 18 (dans nos cultures cellulaires) et 24 h [188]. La première phase G1 a une durée basale de 5 heures. Lorsque la cellule est dans cette phase elle évalue (point de contrôle 1 de la figure 3.21) si le niveau d'ATP est suffisant pour continuer son cycle cellulaire. La cellule a besoin d'énergie pour préparer et amorcer la division, si elle n'en a pas assez, continuer le cycle est risqué. De plus elle évalue si la densité cellulaire autour d'elle n'est pas trop élevée. Si l'un des deux critères n'est pas respecté elle entre en phase G0 (phase dite de quiescence) et elle y reste pendant un temps indéterminé tant que les conditions ne sont pas à nouveau favorables (point de contrôle 2). Dans le chapitre 1 il a été question de la perte de l'inhibition de contact des cellules tumorales. Contrairement aux cellules saines, les cellules tumorales se divisent quand bien-même il y aurait peu de place pour le faire. Cependant, ce phénomène a des limites et bien qu'elles soient plus élevées que pour des cellules saines, les cellules tumorales ne peuvent pas endurer une densité infinie. Une densité de référence a donc été fixée et les cellules subissant une densité supérieure entrent en G0.

Également, en phase G1 si le taux d'oxygène descend un peu trop (sans pour autant être de l'hypoxie), la phase va s'allonger de quelques heures proportionnellement au taux d'oxygène, afin de temporiser le passage irréversible en phase S au cas où les conditions viendraient à se dégrader (point de passage 3) [151]. Lorsque la cellule entre en phase S elle commence à doubler son volume actuel (point de passage 4) en vue de la future division.

À la fin de la phase G2, lorsque la cellule entre en phase M, les valeurs du paramètre γ décrit dans la section précédente sont choisies. Cela correspond à des épimutations ce qui permet d'introduire de la variabilité interne progressivement dans les cellules. En temps normal aurait eu lieu la recombinaison mitotique mais étant un phénomène plus complexe à modéliser et peu adapté à ce modèle, la modification de l'expression épigénétique a été privilégiée. Il est à noter que ce mécanisme n'est pas inclus dans l'intégralité des simulations (voir chapitre 4), seulement celles pour lesquelles, il était souhaitable d'introduire de la variabilité épigénétique. Enfin, à l'issue de la phase M, la cellule ayant doublé de volume se scinde en deux cellules filles de volume identique

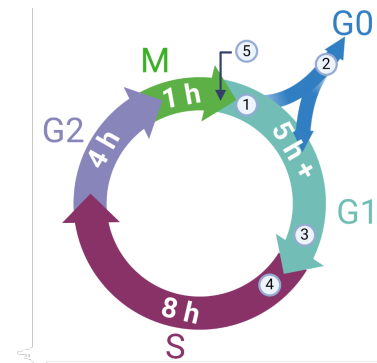


FIGURE 3.21 – Cycle cellulaire utilisé dans la simulation. Les points de contrôles sont indiqués par des numéros encadrés. 1) Évaluation du passage en G0. 2) Évaluation du retour en G1 3) Latence de passage en phase S. 4) Doublement du volume cellulaire. 5) Division cellulaire.

[188]: KATO et al. (2011), « In vitro characterization of cells derived from chordoma cell line U-CH1 following treatment with X-rays, heavy ions and chemotherapeutic drugs »

possédant chacune les mêmes paramètres et concentrations mais qui désormais fonctionneront indépendamment.

L'ensemble des cellules possède donc un cycle commun mais à l'échelle de la population toute entière ce cycle est asynchrone. Les cellules ne sont pas toutes dans la même phase. Ainsi au début de la simulation, à la création des cellules, la phase du cycle de chacune d'entre elles, est tirée aléatoirement avec un poids proportionnel à la durée de chaque phase. Si ce n'était pas le cas toutes les cellules, grossiraient, se diviseraient à peu près en même temps, ce qui n'est pas le cas dans l'absolu (bien que des phénomènes de synchronisation existent ceux-ci doivent être émergents).

Mort

Parmi les deux types de mort que peut subir une cellule, on retrouve la nécrose et l'apoptose. Comme nous l'avons vu, les cellules tumorales échappent principalement à la mort par apoptose mais ne sont pas inconditionnellement immortelles. Dans mon modèle, le paramètre qui détermine la mort cellulaire est l'ATP. Si la cellule se trouve être en dessous d'un seuil critique d'ATP, celle-ci a une forte probabilité d'induire une mort nécrotique. Plus le niveau d'ATP est en dessous du seuil et plus cette probabilité augmente. Ce seuil est arbitrairement fixé à 0.3 mM (les conditions de mort par déplétion d'ATP sont très variables - certaines études évoquent entre 15 et 25% [189] du niveau basal d'ATP ce qui porte approximativement le seuil à cette valeur). Pour protéger la cellule d'une mort engendrée par une perte très momentanée d'ATP (aléas environnementaux / nutriments pris à un instant t par une ou des cellules voisines), la mort n'est possible que si ce déficit se maintient dans le temps (3 heures dans le modèle).

Lorsque la cellule meurt par nécrose, elle entre dans une première étape au cours de laquelle son volume augmente (*necrotic swelling*), puis dans une seconde où celui-ci diminue à nouveau jusqu'à disparaître sous forme de débris (la cellule est détruite et disparaît de la simulation). Pendant cette dernière phase, le glucose, oxygène, lactate et protons intracellulaires sont relâchés dans le milieu pour à nouveau diffuser librement.

3.4.5 Échelle tissulaire

Interactions mécaniques

La seule interaction explicitement définie algorithmiquement entre les cellules de la simulation, est l'interaction mécanique. Une cellule étant ici définie par son centre (PhysiCell étant un modèle

[189]: LEIST et al. (1997), « Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration : A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis »

basé sur les centres), la simulation calcule des forces mises en jeu en prenant en compte l'emplacement du centre des cellules, leur rayon et leurs paramètres d'adhésion et de répulsion. Ainsi on peut définir des profils mécaniques permettant plus ou moins de chevauchement entre les cellules (figure 3.22). Ces forces permettent également d'étendre le tissu lors des divisions cellulaires : les deux cellules filles créées, poussent les cellules aux alentours si elles sont à l'intérieur du sphéroïde ou si elles se situent à la périphérie constituent le front de migration du tissu en adhérant aux cellules adjacentes. Les forces au sein du tissu ne finissent par s'équilibrer durablement, que dans le cas où il ne serait constitué exclusivement de cellules quiescentes. Dans le cas contraire (le plus fréquent), le sphéroïde est en expansion constante.

Densité cellulaire et recherche de voisins

Il est indiqué plus haut que la diffusion dépend de la densité cellulaire locale. Cette densité est calculée à chaque $dt_{mcanique}$ après avoir ajusté la position des cellules. Pour ce faire, le domaine de simulation est discrétisé en une grille recensant pour chaque case quelles cellules s'y trouvent. Pour chaque cellule, sont associées comme voisines, les cellules se trouvant dans la même case et dans son voisinage de Moore d'ordre 2. Cela permet de réduire le temps de calcul de densité unitaire qui sera multiplié par le nombre de cellules présentes. Ensuite pour chaque cellule, sont récupérées les cellules voisines présentes dans une sphère d'échantillonnage au rayon défini (45 micromètres, soit environ 5 cellules de distance). Le volume occupé par l'ensemble des cellules présentes dans le rayon (en totalité si pleinement dans le rayon ou en partie si la cellule est sur le bord du rayon) est ensuite divisé par le volume total de la sphère échantillonnée.

Une mesure de densité locale est ainsi obtenue pour chaque cellule qui est de 1 si le volume occupé par les cellules voisines représente 100% du volume échantillonné mais peut également être inférieure ou supérieure. La raison d'une densité supérieure à 1 provient simplement du chevauchement possible des cellules. Ne pouvant pas obtenir d'autres formes que sphérique dans PhysiCell, les cellules ne peuvent pas non plus occuper l'intégralité de l'espace physique sans chevauchement. Ainsi, pour simuler une densité cellulaire plus réaliste, le seul moyen (dans PhysiCell) est de permettre ce chevauchement partiel et donc potentiellement d'obtenir une densité locale (de simulation) supérieure à 1.

En ajustant les paramètres mécaniques d'adhésion et de répulsion ainsi que le seuil maximum de densité locale (figure 3.23), des profils à peu près similaires aux mesures expérimentales de la littérature sont obtenus sur plusieurs simulations différentes [190].

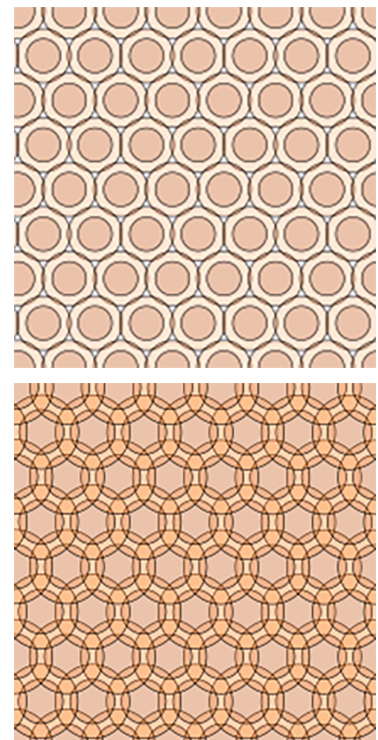


FIGURE 3.22 – Chevauchement des cellules dans le simulateur. En ajustant les paramètres d'adhésion et de répulsion, la densité des cellules augmente en permettant aux cellules de se superposer.

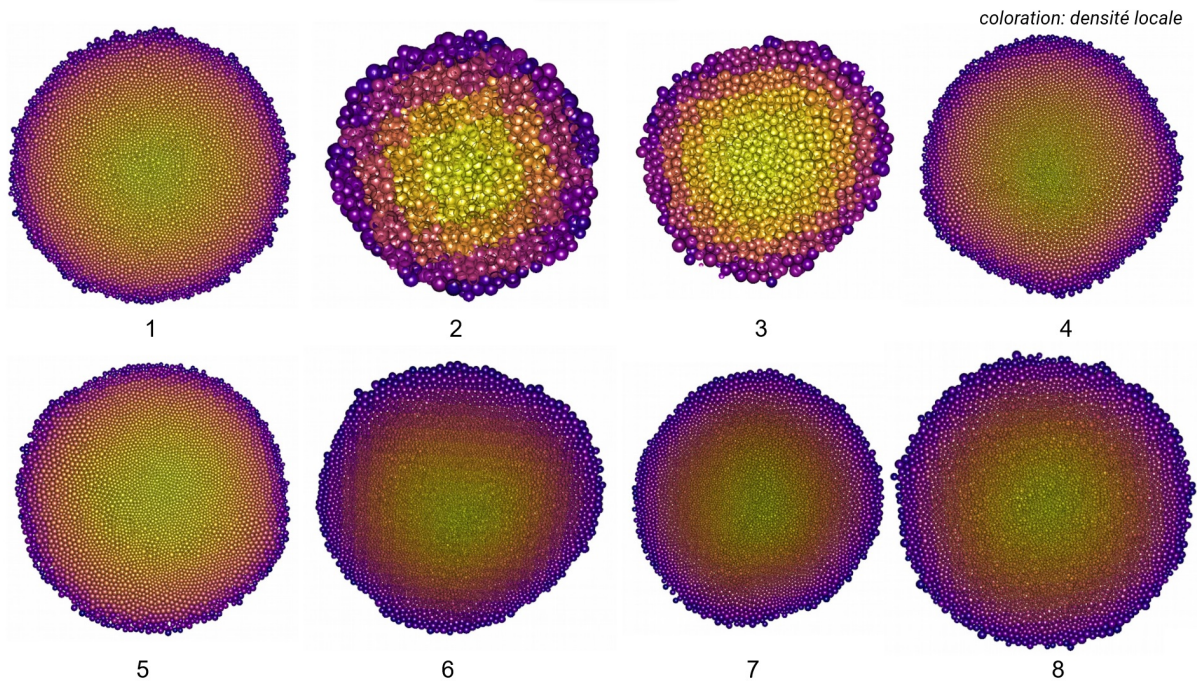


FIGURE 3.23 – Itérations pour définir un profil de densité cellulaire. Le sphéroïde 1 est le profil tissulaire avec les paramètres initiaux de PhysiCell. Les sphéroïdes 2 à 5, sont différentes itérations tests allant d'un chevauchement important à faible. Enfin les sphéroïdes 6 à 8 sont les profils obtenus en ajustant le seuil de densité locale maximum arrêtant la division des cellules. On obtient un gradient de densité non linéaire. C'est le profil 8 qui est choisi pour la suite des simulations car il est similaire aux mesures de densité de la littérature[190].

On retrouve alors un noyau dense, dans lequel la diffusion des substrats est très lente et une périphérie moins compacte avec de l'espace interstitiel. Le profil de densité ainsi obtenu sera présenté dans le chapitre 4.

3.4.6 Choix de programmation

La constitution d'un modèle hybride tel que celui présenté dans ce document ainsi que ses simulations, représente un véritable challenge au niveau computationnel. La principale raison vient du nombre de cellules. Celui-ci pouvant augmenter de manière quasi-exponentielle et, bien que le temps de calcul unitaire par cellule ne bouge pas, le temps global de calcul lui augmente tout autant. Chaque opération, calcul, itérations ainsi ajoutés à une cellule peut avoir de fortes répercussions sur le temps d'exécution et *in fine* sur le temps d'obtention des résultats. C'est notamment le cas pour la résolution du système d'équations différentielles décrivant le métabolisme de chaque cellule. Par exemple, pour simuler une seconde de vie d'une seule cellule, il faut 32 microsecondes de temps de calcul, alors pour 1 h et 15 000 cellules, il faut environ 29 minutes. Ce chiffre sera plus élevé l'heure simulée d'après, en raison des nouvelles divisions qui auront eu lieu. À cela il faut ajouter les autres calculs dont le coup est constant (comme la

diffusion). Le choix d'une simulation en 3D (plutôt qu'en 2D) qui en plus de devoir évaluer n^2 fois plus de voxels, nécessite de réduire le pas de temps de diffusion, ce qui augmente considérablement le temps de calcul (de l'ordre de 12 h pour 1 h de temps simulé en reprenant l'exemple précédent). Ces temps sont obtenus en ayant effectué un maximum d'optimisations algorithmiques pour tenter de simuler entre 20 et 30 jours de vie cellulaire d'un sphéroïde.

De plus pour suivre l'ensemble de la simulation au cours du temps (aussi bien pour s'assurer qu'il n'y a pas d'erreurs que pour éviter d'attendre trop longtemps les résultats), il a fallu développer des outils pour l'analyser en temps réel.

Enfin la quantité de données générées étant très importante et les données elles-mêmes très hétérogènes, leur exploration est complexe et il est souvent difficile de "qualifier" un résultat de simulation comme aberrant ou non, n'ayant bien souvent pas une vue d'ensemble suffisante.

Parallélisme

Pour accélérer le programme et réduire le temps de calcul global, la principale solution est de paralléliser du code. La parallélisation d'un programme consiste à répartir des instructions sur plusieurs processeurs ou plusieurs cœurs afin qu'elles soient traitées simultanément.

Pour prendre un exemple simple, au lieu de trier un paquet de carte seul, on le découpe en cinq tas et on demande à quatre autres personnes de trier chacun leur tas. Idéalement on peut penser que le temps d'exécution total sera cinq fois plus rapide. En pratique ce n'est pas le cas, car il faut expliquer la procédure aux quatre personnes, les coordonner, attendre que la personne la plus lente termine et enfin, ranger chaque tas dans le paquet en s'assurant que tout est en ordre. Le coup de toute cette opération ne devient rentable que si le temps de triage est suffisamment grand au regard du temps de coordination ou que le temps de coordination est négligeable par rapport au temps d'exécution d'une personne seule.

Au niveau d'un processeur c'est la même chose. Pour paralléliser une tâche, il doit d'abord découper la tâche de manière intelligente en équilibrant la charge de travail, instruire chaque autre processeur (dans le cas d'une parallélisation distribuée interprocesseur) ou cœur (dans le cas d'une parallélisation partagée intraprocésseur) des instructions à réaliser, attendre le cas échéant que tous les processeurs aient terminé et collecter les résultats. Un exemple simple issu du modèle est la résolution du métabolisme cellulaire de chaque cellule. Le programme découpe à chaque pas de temps,

la liste de toutes les cellules de la simulation en 16 groupes, les répartis sur les 16 cœurs de l'ordinateur utilisé et chaque cœur traite les $n/16$ cellules séparément. Enfin les résultats sont actualisés et collectés dans une nouvelle liste qui remplace l'ancienne. Certaines tâches ne sont cependant pas parallélisables, lorsque des sections de code ont besoin d'un résultat qui n'est pas accessible s'il est réalisé par une autre unité de calcul ou lorsque ces dernières doivent écrire en même temps un résultat au même endroit de la mémoire.

La parallélisation d'un code est relativement triviale en C++ en utilisant OpenMP (bibliothèque intégrée avec la majorité des compilateurs cpp) mais nécessite une bonne compréhension des opérations effectuées à chaque section du code. OpenMP permet seulement de paralléliser le code sur un processeur multicœur (mémoire partagée), contrairement à MPI (mémoire distribuée) qui ne le fait entre processeurs différents. La parallélisation MPI est plus complexe à développer et nécessite pour être rentable d'avoir accès à un cluster de calcul.

On peut également effectuer ces parallélisations sur une ou des cartes graphiques qui sont un peu plus lentes pour chaque calcul par cœur mais qui possèdent un nombre de cœurs bien plus grand. Ce type d'opération est très utilisé en intelligence artificielle, en vision assistée par ordinateur ou encore dans les jeux vidéos mais demande d'avoir des matrices de données très grandes pour être rentable par rapport aux processeurs. En effet, en plus des processus de coordinations évoqués, une carte graphique doit recevoir les instructions depuis le processeur, charger les données dans sa propre mémoire et renvoyer les résultats ce qui rajoute un temps non négligeable au temps de calcul.

Le code est parallélisé avec OpenMP et le portage sur carte graphique s'est révélé infructueux, son utilisation ne devenant rentable que pour un nombre de cellules supérieur à 150 000, nombre atteignable en plusieurs années de calcul sur nos processeurs et supérieur au nombre de cellules présentes dans un sphéroïde.

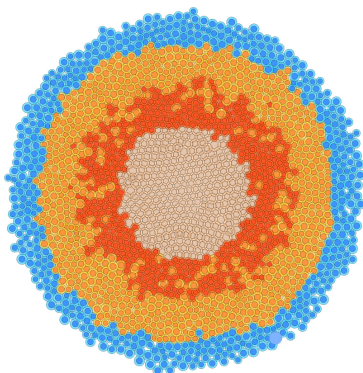


FIGURE 3.24 – Simulation 2D issue du premier modèle réalisé. En beige au centre, les cellules sont mortes, en rouge quiescentes, en orange et bleu prolifératives (avec des profils métaboliques différents). Ici l'ensemble des cellules de la simulation sont représentées

2D & 3D

Les simulations ont été réalisées alternativement en 2D et en 3D. La 3D est plus réaliste, le tissu est plus compact, les cellules occupant plus facilement l'espace libre ce qui modifie à la fois la densité et l'accès aux nutriments. En ajoutant une dimension spatiale on permet finalement plus d'hétérogénéité à tous les niveaux.

Mais comme indiqué précédemment, les simulations en 3D ont un coût en temps de calcul extrêmement important. Pour tester de nombreux scénarios de simulation elle devient (sur nos machines)

un frein. Ainsi, la plupart des simulations sont effectuées en 2D : une seule couche de cellules (cela reste des sphères) qui ne peuvent être déplacées qu'en x et y.

L'ensemble des mécanismes modélisés reste le même et dans la plupart des cas les conclusions restent transposables avec la 3D. En effet, les paramètres d'adhésion et de répulsion ont été calibrés afin que les simulations en 2D comme en 3D présentent les mêmes niveaux de densité locale. Les simulations en 3D servent à comparer les éventuelles différences de morphologie tissulaire ou de répartition des gradients et offrent potentiellement un niveau d'hétérogénéité spatiale supplémentaire.

Modes de visualisation

J'ai développé un ensemble d'outils pour explorer en temps réel, les simulations au cours du temps. L'un d'entre eux, est une interface utilisant la bibliothèque Shiny [191] écrit en langage R. Dans cette interface chaque pas de temps de simulation issue de PhysiCell est chargé et affiche un ensemble de diagrammes, cartes, graphes, chacun configurable pour toutes les variables de la simulation. Ces diagrammes seront montrés plus en détail avec les résultats dans le prochain chapitre.

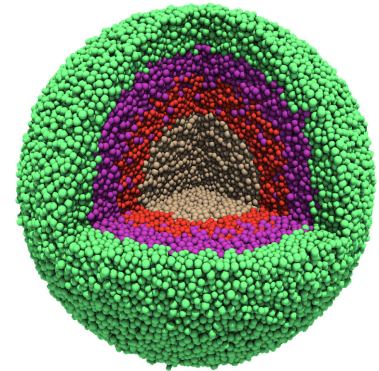
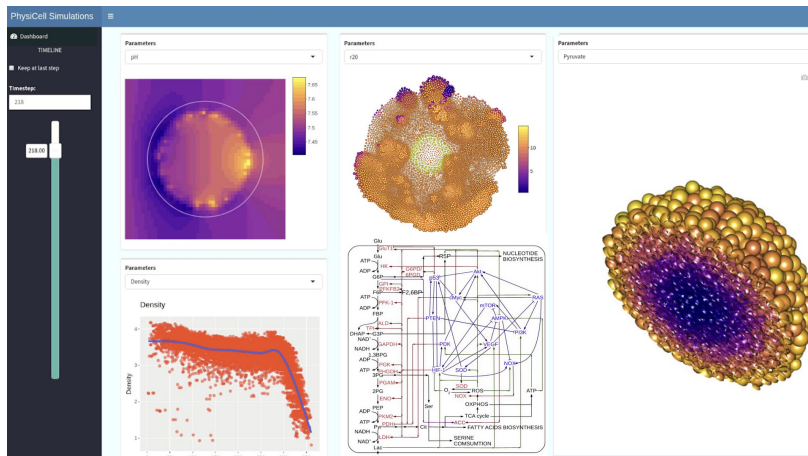


FIGURE 3.25 – Simulation 3D issue du premier modèle réalisé. En gris au centre, les cellules sont mortes, en rouge quiescentes, en violet et vert prolifératives (avec des profils métaboliques différents). Une partie des cellules ont été masquées afin d'apercevoir les différentes couches et le centre de la tumeur.

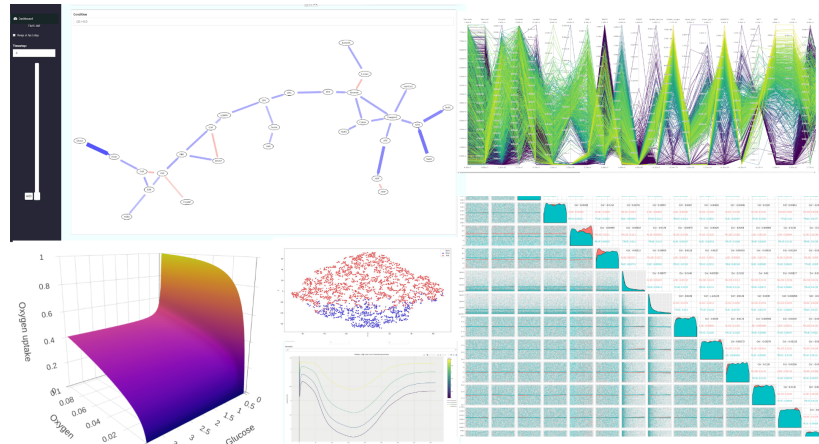
[191]: RSTUDIO, INC (2013), *Easy web applications in R*.

FIGURE 3.26 – Interface de simulation Shiny.

Malgré tous les avantages qu'offre cet outil pour suivre ces simulations, il n'échappe pas à certains écueils inhérents à toutes les approches traditionnelles de représentations des données et notamment celui du manque de synthèse visuelle. Avec l'ensemble des figures et combinaison de figures à afficher il est difficile de synthétiser l'information quand bien même l'ensemble des figures serait affiché sur plusieurs écrans.

C'est pourquoi j'ai développé en parallèle, un logiciel (figure 3.28) de visualisation de données scientifiques pour répondre aux problématiques d'agrégation spatiale de l'information en les

FIGURE 3.27 – Exemples de représentations intégrées dans l'interface de simulation. L'interface permet entre autres d'explorer les flux métaboliques d'une cellule à un instant précis. Regarder la répartition de 3 variables au sein d'une population ou encore regarder leurs corrélations.



portant en 3D (via les technologies de réalité virtuelle et augmentée) et en mettant l'accent sur la cognitive. Pour l'instant ce logiciel est spécialisé dans l'affichage des résultats des simulations issues de PhysiCell, mais l'objectif pour les années à venir est de développer cet outil pour l'étendre à tous types de visualisation scientifique. Un dépôt d'invention logiciel a été effectué en accord avec le laboratoire et l'Université Grenoble-Alpes.

FIGURE 3.28 – Logiciel DIVE. Le logiciel en cours de développement a pour objectif de proposer un écosystème de visualisation et de collaboration scientifique au sein d'un environnement virtuel 3D.



Conséquences des conditions environnementales sur le métabolisme tumoral

4

Dans ce chapitre, les simulations issues du modèle sont explorées en détail afin de répondre aux problématiques décrites dans les chapitres précédents.

Dans un premier temps, une simulation de référence se rapprochant des conditions de culture *in vitro* des sphéroïdes sera présentée. Cette simulation est caractérisée principalement par des conditions favorables à la croissance d'un sphéroïde avec de l'oxygène et du glucose en concentration suffisante, régulièrement renouvelés depuis les bords, pratiquement pas de lactate et un pH maintenu à un niveau physiologique.

Dans un second temps, à partir de cette simulation de référence, plusieurs scénarios seront testés pour regarder l'effet des variations des conditions environnementales sur la croissance des sphéroïdes et leur évolution métabolique. Par exemple, le milieu pourra ne pas être renouvelé en utilisant des conditions aux bords de Neumann (système fermé) ou les concentrations modifiées pour imposer des situations de stress métabolique.

Chacune de ces simulations a le potentiel de faire émerger un type différent de morphologie de sphéroïde. L'objectif est de suivre l'évolution métabolique le plus longtemps possible (pour atteindre idéalement entre quinze et vingt de jours de vie qui est le temps de maturation des sphéroïdes des expériences *in vitro* réalisées au sein de l'équipe). Cependant, les simulations peuvent être arrêtées avant pour plusieurs raisons : si le sphéroïde atteint les bords du domaine de simulation (manque de place pour la croissance), si toutes les cellules sont mortes ou encore si pour atteindre la durée visée, le temps de simulation est trop long (c'est notamment le cas pour les simulations en 3D).

Une note sur la taille des sphéroïdes. Les simulations présentées dans ce chapitre étant pour la plupart en 2D et les cellules ne pouvant se déplacer que sur un plan, les sphéroïdes ont un diamètre plus large que sur des sphéroïdes *in vitro* observés par microscopie. Le but ici n'est pas de comparer quantitativement leur taille et leur vitesse de croissance mais simplement de retrouver des structures communes pour apprécier leurs similarités. Dans les figures qui suivront, les coupes de sphéroïdes sont des coupes frontales. Bien que dans la quasi-totalité des simulations les conditions aux bords sont les mêmes sur chaque côté du domaine, le haut de la figure est considéré comme le haut du puits dans lequel est plongé le sphéroïde (par analogie aux expériences réalisées en parallèle). Il

4.1	Simulation de référence	86
4.1.1	Conditions initiales	86
4.1.2	Morphologie tissulaire	87
4.1.3	Gradients et profils radiaux	88
4.1.4	Phénotypes émergents	91
4.1.5	Paysage métabolique	93
4.2	Oscillations d'oxygène	95
4.3	Chocs acides	102
4.4	Déplétion de glucose	107
4.5	Complexité des comportements émergents	111
4.5.1	Complexité morphologique	111
4.5.2	Complexité métabolique	114
4.5.3	Complexité des interactions	118
4.5.4	Influence du réseau de régulation génétique	124
4.6	Bilan des résultats	126

est à noter que la simulation n'intègre pas la gravité, donc même si le sphéroïde repose conceptuellement au fond d'un puit, les cellules ne sont pas attirées vers le fond de ce dernier.

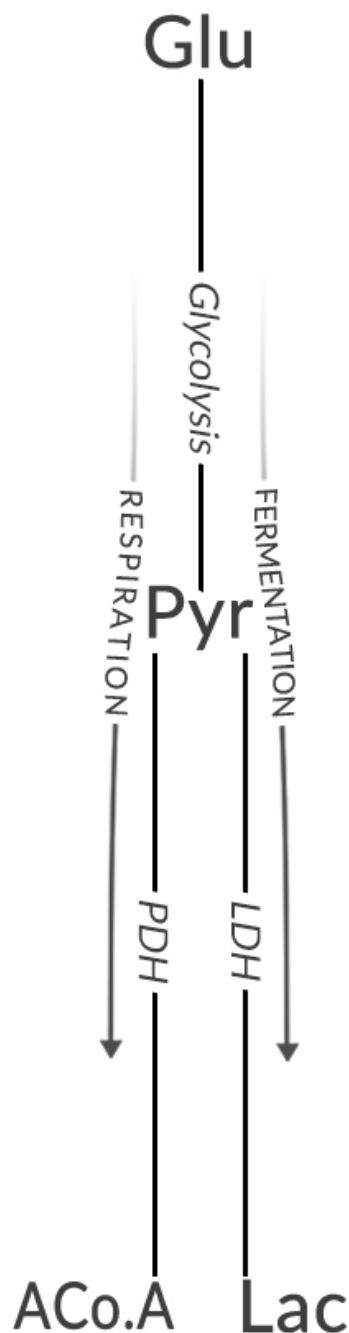


FIGURE 4.1 – Rappel des voies métaboliques abordées.

[192]: PLACE et al. (2017), « Limitations of oxygen delivery to cells in culture : An underappreciated problem in basic and translational research »

TABLE 4.1 – Paramètres généraux des simulations 1 à 5. Initial (Init.) et Fin correspondent aux nombres de cellules dans la simulation au début et à la fin de celle-ci. La durée est le temps total de simulation. Les conditions de Dirichlet aux bords, également concentrations de départ de la simulation sont renseignées avec l'oxygène (O_2) exprimé en mmHg, le glucose (Glu.) et le lactate (Lac.) en mM et le pH sans unité. Lorsque la mention "-N" succède à ces valeurs, cela indique que les conditions aux bords sont des conditions de Neumann (les valeurs correspondent alors seulement aux concentrations initiales).

N°	Type	Init.	Fin	Durée	O_2	Glu.	Lac.	pH
1	2D	440	50000	443 h	38.0	6.0	0.1	7.4
2	2D	48	71000	570 h	38.0	6.0	10	7.4
3	2D	440	35000	695 h	16.5	6.0	0-N	7.4
4	2D	440	17500	707 h	9.22	6.0	0-N	7.4
5	3D	440	12000	110 h	38.0	5.0	4.57-N	7.5-N
5 bis	2D	440	12000	110 h	38.0	5.0	4.57-N	7.5-N
6	2D	440	37500	420 h	160.0	1.0	0-N	6.7-N

4.1 Simulation de référence

Dans les expériences réalisées sur les sphéroïdes au sein de l'équipe, ces derniers sont cultivés dans un milieu renouvelé régulièrement. Le glucose dans le milieu est en abondance et l'oxygène est maintenu à pression atmosphérique dans l'incubateur. Il n'y a pratiquement pas de lactate dans le milieu et le pH est fixé à différentes valeurs en utilisant des solutions tampons.

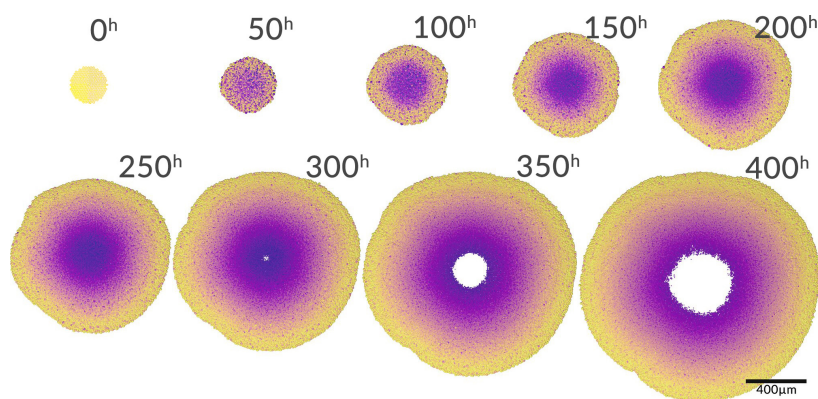
4.1.1 Conditions initiales

Ainsi, pour établir une simulation de référence se rapprochant des conditions de culture, la concentration de glucose au début de la simulation est fixée à 6 mM. Cette même concentration est imposée comme valeur constante sur les bords du domaine (condition de Dirichlet). L'oxygène est fixé à 38.0 mmHg. Cela ne correspond pas à la pression atmosphérique, mais les sphéroïdes étant plongés dans le milieu de culture liquide au fond de puits étroits et l'ensemble n'étant pas agité pour ne pas décoller les sphéroïdes, il est plus que probable que la pression d'oxygène ne soit pas aussi élevée qu'à l'extérieur de la cuve. Il peut ainsi y avoir des différences conséquentes entre la pression atmosphérique d'oxygène et celle qui s'établit au sein du milieu de culture [192]. Par défaut la concentration d'oxygène est fixée sur la valeur mesurée *in vivo* au sein des tissus. Cette valeur diffère de celle du milieu de culture *in vitro* mais à l'avantage d'être plus physiologique pour mieux capter

la réalité du métabolisme. Le lactate est en très faible quantité (0.1 mM) et le pH est fixé à 7.4 (pH physiologique).

Pour les trois substrats (oxygène, glucose et lactate) et le pH, les conditions aux bords de Dirichlet correspondent aux valeurs fixées pour les conditions initiales. Le milieu de culture des sphéroïdes étant régulièrement renouvelé, les conditions de Dirichlet reproduisent ce renouvellement en considérant la concentration de glucose constante aux bords. Cela n'empêche pas de faire émerger des déplétions au sein de l'environnement des sphéroïdes. L'oxygène est également maintenu constant passivement par contact avec l'air et lors du renouvellement du milieu de culture. Le lactate est éliminé régulièrement et le pH est maintenu par des solutions tampons. Les conditions de Dirichlet sont adaptées dans les quatre cas. En début de culture, les sphéroïdes sont très petits et ne contiennent qu'une centaine de cellules (environ 400). C'est ce nombre de cellules qui est utilisé au départ de la simulation.

4.1.2 Morphologie tissulaire



La figure 4.3 montre la croissance du sphéroïde de la simulation 1 de référence. Au niveau morphologique, il s'agit d'un sphéroïde à cœur nécrotique. Les sphéroïdes à cœur nécrotique sont les plus courants. Un cœur nécrotique apparaît là où la déplétion en nutriments, les conditions d'acidité ou encore la densité cellulaire se font trop fortes. Il est relativement homogène et sphérique. Les cellules mortes sont progressivement éliminées de la simulation, laissant place à du vide qui biologiquement correspondrait en réalité à un amas de reste de membranes et d'organites (figure 4.2). Il n'y a donc pas d'affaissement des cellules sur leur cœur, maintenant ainsi l'intégrité structurelle de l'ensemble.

La répartition de la densité au sein des sphéroïdes pleins et à cœur nécrotiques, suit généralement celle de la figure 4.4.¹ Au cœur du sphéroïde la densité est élevée et suit une forme de plateau qui décroît très légèrement pour ensuite décroître fortement en

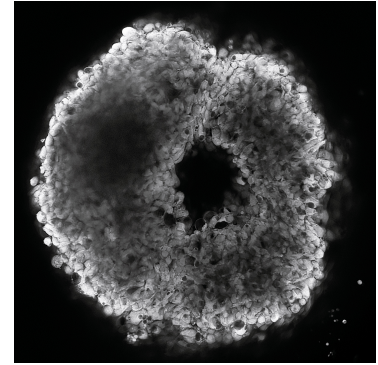


FIGURE 4.2 – Sphéroïde de cellules F98. Ce sphéroïde d'environ 390 μm , a été obtenu à partir de cellules F98 (gliome de rat). Les cellules ont ensuite été marquées avec une sonde fluorescente, le BCECF, qui permet de mesurer le pH cellulaire. Le centre du sphéroïde est vide de cellule et donc ne renvoie pas de fluorescence. Cette zone correspond à un cœur nécrotique.

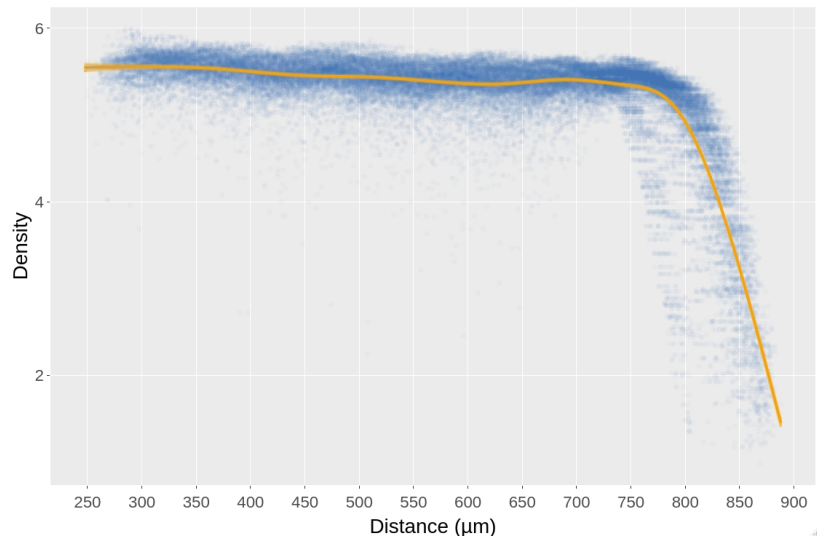
FIGURE 4.3 – Croissance du sphéroïde de la simulation 1. Chaque image est espacée de 50h depuis $t=0$ jusqu'à $t=400\text{h}$. La coloration est relative à chaque pas de temps et indique l'ancienneté des cellules. Plus une cellule est violette plus elle est âgée par rapport aux autres cellules.

Note 1

Comme dis précédemment, la densité permise au sein du tissu, est sciemment supérieure à 1 pour palier au fait que les cellules dans PhysiCell sont parfaitement sphériques et ne peuvent pas combler parfaitement l'espace. De plus, avec des simulations en 2D, il est nécessaire d'augmenter artificiellement le chevauchement des cellules pour obtenir un nombre de cellules par voxel, plus proches de la réalité expérimentale dans lesquelles les cellules cancéreuses même en culture cellulaire 2D se superposent les unes sur les autres.

s'approchant de la périphérie. Dans le chapitre précédent, la densité locale a été décrite et lorsque la cellule se retrouve à un niveau de cette densité fixé à 5.5 en 2D (pour s'approcher en densité réelle des profils de la littérature), celle-ci entre en quiescence dès qu'elle en a la possibilité. Cela signifie qu'elle doit d'abord terminer son cycle et se diviser si la phase G1 a été franchie. Ceci implique, que la densité de l'ensemble des couches nécrotiques et quiescentes, n'est pas strictement à 5.5, mais peut-être légèrement supérieure le temps que les cellules finissent leurs cycles.

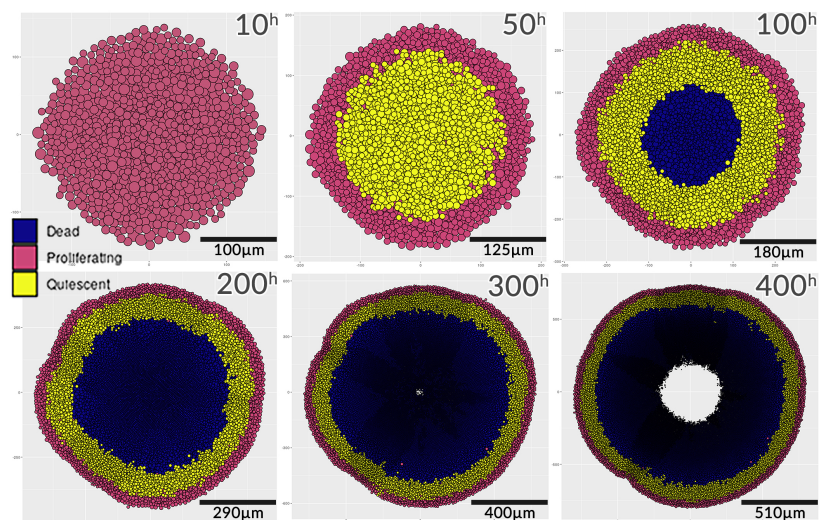
FIGURE 4.4 – Profil de densité en fin de simulation du sphéroïde de la simulation 1 à 400h. Chaque point correspond à une cellule de la simulation. La distance affichée est la distance depuis le cœur du sphéroïde jusqu'à sa périphérie. La densité est la densité locale décrite dans le chapitre 3.



4.1.3 Gradients et profils radiaux

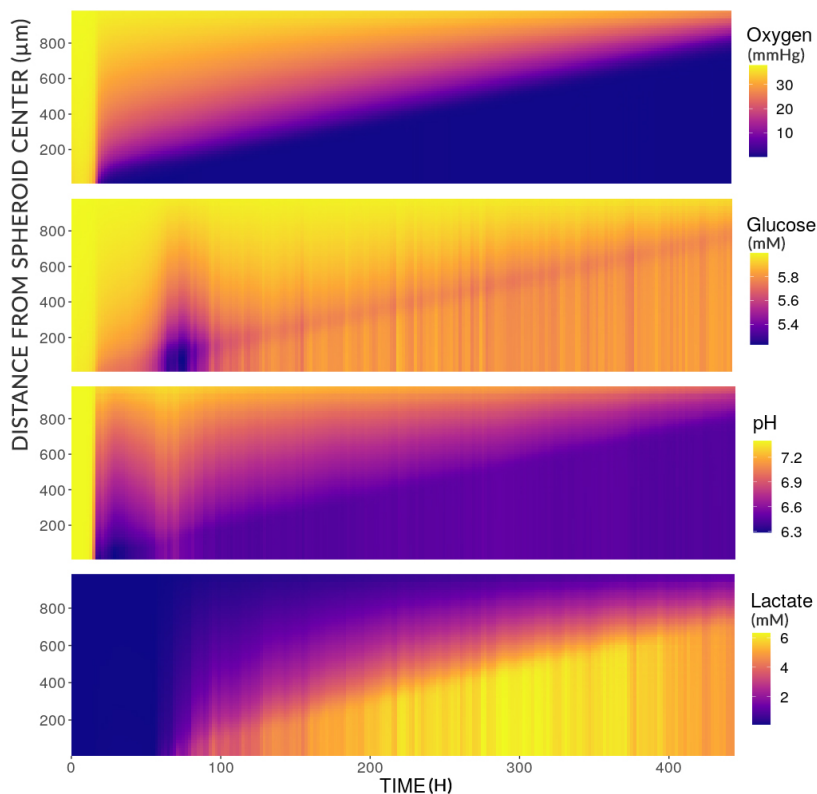
L'avantage principal d'un sphéroïde est qu'il s'agit d'un modèle tissulaire simple à symétrie radiale. Ainsi la majorité de l'hétérogénéité émergente se fait le long de ce profil radial (aussi bien en 2D qu'en 3D). Cela provient de l'exposition aux différents gradients de substrats diffusés dans l'environnement.

FIGURE 4.5 – Répartition des états cellulaires du sphéroïde de la simulation 1 au cours du temps. Les six figures présentent l'évolution de la simulation de 10 h de vie du sphéroïde jusqu'à 400 h. En bleu les cellules ont commencé le processus nécrotique, en jaune les cellules sont en état de quiescence (G0) et en rose, en état prolifératif (G1,S,G2,M). En noir les débris cellulaires, sont progressivement supprimés de la simulation.



Le premier profil émergent est celui de la répartition des états cellulaires (figure 4.5). Sur cette figure et sur le graphe de croissance du sphéroïde (figure 4.6), celui-ci commence sa croissance avec uniquement des cellules en prolifération. Aucune n'est entrée en phase G0 et les conditions extérieures permettent le développement de la tumeur.

Ici cependant, à 50 h on observe l'apparition d'une couche cellulaire isolée, de cellules quiescentes. Ceci provient de la stabilisation de la densité cellulaire. Les cellules n'ont plus de place pour croître et la perfusion des nutriments commence à diminuer. À 100 h, un cœur nécrotique apparaît. Les conditions d'oxygène, de glucose et de pH, bien que relativement favorables à l'extérieur de la simulation ne sont pas suffisantes pour compenser l'hypoxie ou la déplétion en glucose ainsi que l'acidité qui s'installent au centre. Ce cœur nécrotique perdure jusqu'à la fin de la simulation. À partir de 300 h, les cellules les plus au centre sont mortes et transformées en débris, laissant un trou à la place.



La figure 4.7 montre l'évolution des concentrations des substrats dans le milieu entourant le sphéroïde de la simulation 1. Pour chaque substrat, la valeur des concentrations présentes dans chaque voxel est moyennée avec celles des autres voxels ayant la même distance par rapport au centre du sphéroïde. Ces profils de concentration en fonction de la distance au centre (axe des ordonnées) sont calculés pour chaque pas de temps de la simulation (abscisses).

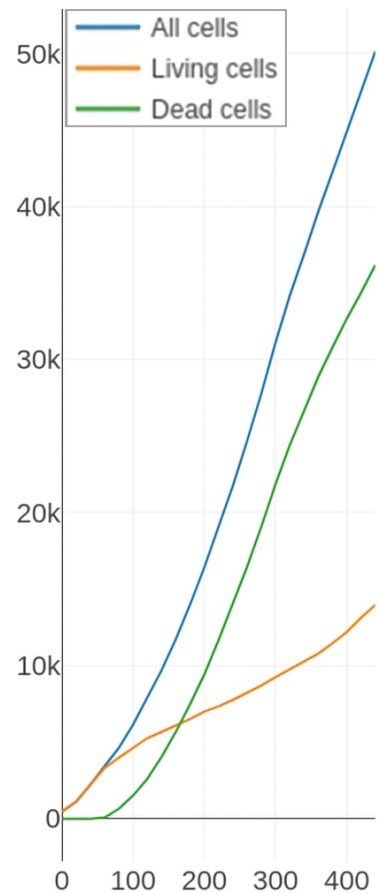


FIGURE 4.6 – Évolution de la population cellulaire dans le sphéroïde de la simulation 1.

FIGURE 4.7 – Profils radiaux moyens des concentrations en substrats dans l'environnement de la simulation 1 au cours du temps. Les quatre figures présentes vont jusqu'à 443 h de vie du sphéroïde.

La figure montre ainsi que jusqu'à environ 20 h de simulations, les vitesses de diffusions de l'oxygène et du glucose sont suffisamment rapides et la consommation des cellules trop faible pour entraîner une déplétion visible dans le milieu (surface jaune). Ce temps correspond à peu près au temps nécessaire pour que toutes les cellules de la simulation aient effectué au moins un cycle cellulaire complet (et donc une division entraînant l'augmentation de la densité). La déplétion en oxygène augmente alors de manière quasi linéaire ne laissant principalement que les premières couches de cellules avoir accès pleinement à l'oxygène. Les couches internes peuvent également avoir accès à l'oxygène mais en moindre quantité, déplaçant systématiquement toutes les molécules qui parviendraient jusqu'à elles. Le pH également diminue indiquant une consommation de glucose et une production de lactate. Entre 50 et 100 h, le pH redevient très brièvement neutre et la concentration en glucose diminue soudainement.

Ceci indique un manque de pyruvate et une compensation de ce manque en récupérant le peu de lactate dans le milieu (et donc des protons). En rehaussant le pH extracellulaire (et le pH intracellulaire dans une moindre mesure), la glycolyse n'est plus inhibée et la consommation en glucose réaugmente. Le lactate n'est cependant pas présent en grande quantité et seule la glycolyse permet alors de maintenir les niveaux nécessaires de pyruvate pouvant être utilisés par la mitochondrie. Ceci ré-entraîne une chute du pH dans les couches internes du sphéroïde inhibant de nouveau la glycolyse.

À partir de 100 h, le lactate est présent en plus grande concentration, mais il ne peut plus servir à reconstituer le pyruvate au sein de la cellule, car ce dernier n'est de toute façon plus consommé par manque d'oxygène. Il en résulte que seules, les couches en périphérie du sphéroïde ont accès à l'oxygène et bien que le glucose soit disponible, il ne suffit pas à produire le niveau d'ATP nécessaire pour maintenir les cellules des couches les plus profondes en vie. Les cellules des couches périphériques utilisent bien l'oxygène et le glucose (cela se voit par la ligne violette dans le profil de glucose), produisant lactate et acidité dans les couches internes.

Comme détaillé dans le Chapitre 3, les paramètres du modèle γ définissant les forces de régulation des gènes entre eux et des gènes sur les enzymes et métabolites sont régulièrement changés (voir la section Section 3.4.3) au sein de la population du sphéroïde. Les cellules n'ont donc pas un système unique mais sont soumises à de la variation qui peut s'avérer bénéfique pour elles ou non. Si la répartition des états cellulaires se fait par couches, la répartition des forces de régulation se fait le long de rayons allant du centre à la périphérie du sphéroïde.

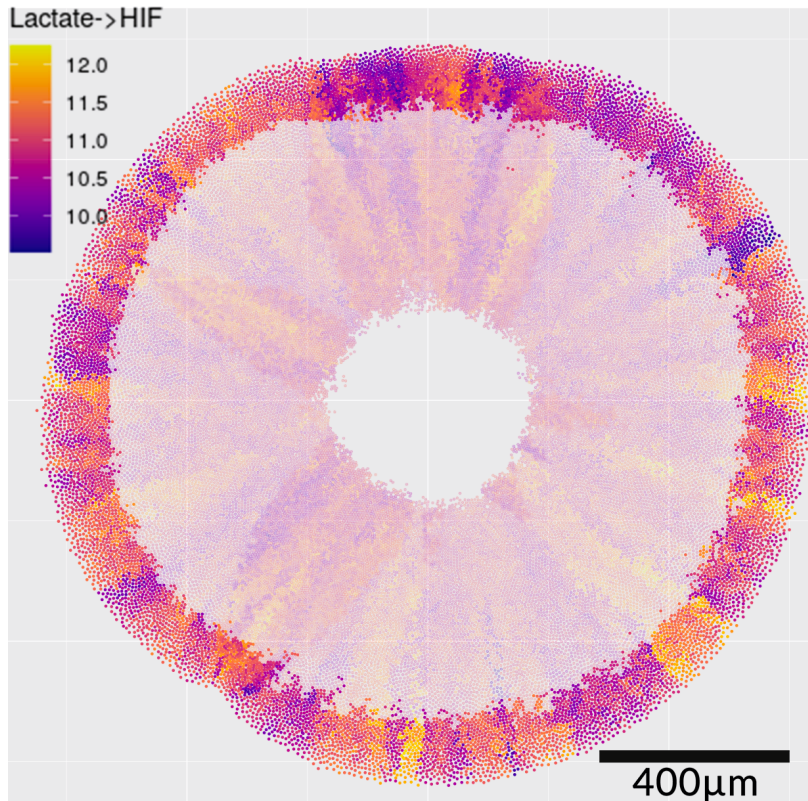


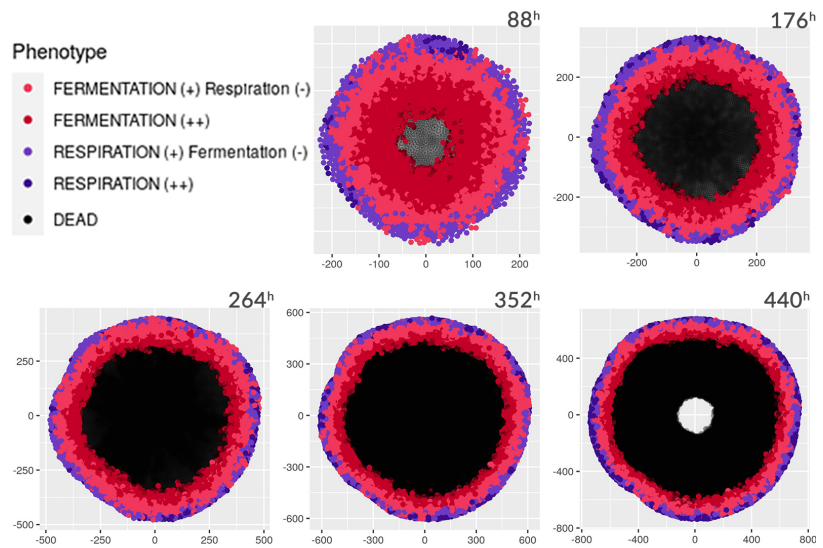
FIGURE 4.8 – Force de régulation du Lactate sur l’expression d’HIF à 400 h. La coloration du sphéroïde dépend de la valeur du paramètre γ qui définit la force de régulation du Lactate sur HIF. Les cellules dont l’opacité est plus faible sont des cellules en nécrose.

En effet, le front de prolifération des cellules tend vers l’extérieur car les forces de pression exercée entre les cellules poussent généralement, lors de la division, les cellules filles dans un cône restreint. Ainsi les changements aléatoires du paramètre γ lors des divisions se concentrent dans ce champ conique. La figure 4.8, présente la variation du paramètre γ agissant sur la régulation de l’expression d’HIF par le lactate à 400 h. γ varie environ entre 9.0 et 12.0 et montre en quelque sorte l’historique prolifératif des cellules concentrées autour de ces cônes prolifératifs.

4.1.4 Phénotypes émergents

La figure 4.9 présente le phénotype métabolique de la simulation 1. Pour évaluer le phénotype des cellules de la simulation, les flux impliquant le pyruvate, à l’intersection entre glycolyse, lactate et acétyl-CoA, sont mesurés. Ici ce qui est observé c’est la répartition des flux de pyruvate dans la respiration ou la fermentation et non pas la quantité d’ATP qui en résulte. Ainsi, si la valeur de flux de r12 (réaction catalysée par la lactate déshydrogénase - voir la table 3.1) est supérieure à la valeur de flux r18 (réaction catalysée par la pyruvate déshydrogénase) alors le phénotype est essentiellement fermentatoire, avec un peu de respiration (en rouge clair) sur les figures. Si r12 est 10x supérieur à r18, c’est à dire plus de 90% du pyruvate dirigé vers la production de lactate, alors le phénotype est considéré comme fermentatoire prononcé (rouge foncé).

FIGURE 4.9 – Phénotypes des cellules du sphéroïde de la simulation 1 au cours du temps. Les cellules sont ici représentées avec une taille identique afin de mieux visualiser les phénotypes. Lorsqu'un processus est décrit avec un (-) cela signifie qu'il est présent mais en proportion plus faible que celui marqué par un (+). Les cellules noires sont en nécrose.



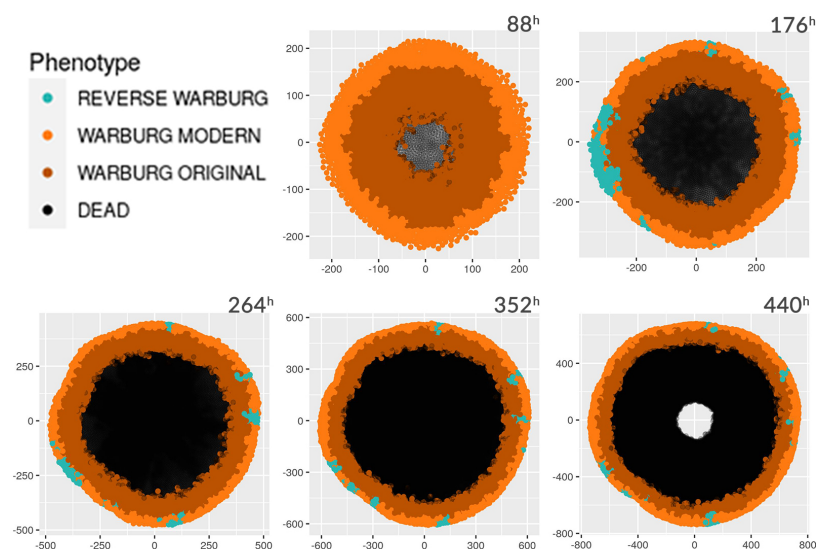
La situation inverse r18 supérieur à r12 (et 10x supérieur) donnent le phénotype respiratoire (violet) et respiratoire prononcé (violet foncé).

TABLE 4.2 – Paramètres généraux de la simulation 1 (Rappel de la table 4.1)

N°	1
Type	2D
Nb. initial	440
Nb. final	50 000
Durée (h)	443
O ₂ (mmHg)	38.0
Glucose (mM)	6.0
Lactate (mM)	0.1
pH	7.4

Tout au long de la simulation la couche de cellules la plus externe conserve un métabolisme majoritairement oxydatif souvent couplé à un peu de fermentation (cellules violettes). Certaines cellules (violette foncée) ont un métabolisme oxydatif prononcé mais il ne perdure pas longtemps dans le temps. Les cellules dans les couches en dessous commencent à fermenter plus qu'elles ne respirent, le manque d'oxygène ainsi que le lactate provenant des couches inférieures favorisant cet état. Enfin les cellules encore en vie des couches les plus profondes fermentent exclusivement n'ayant pas d'oxygène à disposition.

FIGURE 4.10 – Effet Warburg et Warburg inverse des cellules du sphéroïde de la simulation 1 au cours du temps. Les cellules noires sont en nécrose.



En regardant maintenant les flux de lactate et notamment en labellisant ces phénotypes par la manifestation de l'effet Warburg ou Warburg inverse, les résultats peuvent sembler surprenant.

Sur la figure 4.10, deux définitions de l'effet Warburg sont représentée. La définition moderne (en orange clair), correspondant à la production de lactate en présence d'oxygène (indiquant donc que du pyruvate est transformé en lactate plutôt qu'en acétyl-CoA). La définition originale correspondant à la simple excrétion de lactate dans la tumeur est représentée en orange foncée. Une petite précision cependant, ici aucun seuil minimum n'est défini pour qualifier une excrétion de lactate comme correspondant à l'effet Warburg. Enfin, l'effet Warburg inverse (concrètement l'import de lactate par la cellule) est en bleu clair.

L'effet Warburg semble dominer les phénotypes cellulaires de la tumeur à quelque exceptions près d'effet Warburg inverse. Ceci indique que même les cellules qualifiées précédemment de respiratoire ou de respiratoire prononcé excrète du lactate. Dans les faits ces dernières en secrètent en bien plus faible quantité que les cellules en hypoxie. En réalité, ce n'est pas parce que le lactate est produit par la cellule qu'il en est excrété et l'inverse également. Les expériences effectuées sur la relation entre concentration d'acide lactique intracellulaire et extracellulaire [54] montrent que globalement ces concentrations s'équilibrent. Une cellule ayant donc accumulé du lactate à un moment donné peut l'excréter plus tard lorsque le gradient s'inverse tout en ayant en même temps un métabolisme respiratoire. Se pose donc la question des critères nécessaires pour qualifier précisément l'effet Warburg ou Warburg inverse, lorsque observé à l'échelle cellulaire et sur la pertinence de tels critères.

4.1.5 Paysage métabolique

Dans la publication *"Uncovering the Underlying Mechanisms of Cancer Metabolism through the Landscapes and Probability Flux Quantifications"* [84] dont est partiellement issu le modèle présenté, des zones d'attractions métaboliques sont décrites mais également des phases de transitions entre ces zones. Les états métaboliques y sont décrits comme des bassins liés de manière continue les uns aux autres. Quatre bassins d'attractions sont identifiés ("normal", "cancer oxydatif", "cancer glycolytique", "cancer intermédiaire") par les niveaux d'expression de gène LDH et PDH. Dans ce document, ces quatre bassins d'attractions seront nommés "neutre", "oxydatif", "glycolytique" et "intermédiaire" pour ne pas forcer de distinction entre un mode sain et cancéreux. En choisissant ces deux gènes, c'est la bifurcation au niveau du devenir du pyruvate qui est évalué.

L'intérêt également de regarder les niveaux de ces gènes par rapport aux réactions sur lesquelles ils agissent (respectivement r12 et r18), c'est que la variation dans leur niveau d'expression est plus "lent" ce qui permet de regarder les effets à relativement moyen terme de l'environnement sur le métabolisme de la cellule plutôt que sa réponse immédiate aux fluctuations environnementales.

Il est donc intéressant de regarder les changements dans la topologie de ce paysage mais en regardant principalement la capacité des cellules à s'y déplacer c'est-à-dire à atteindre les zones identifiées.

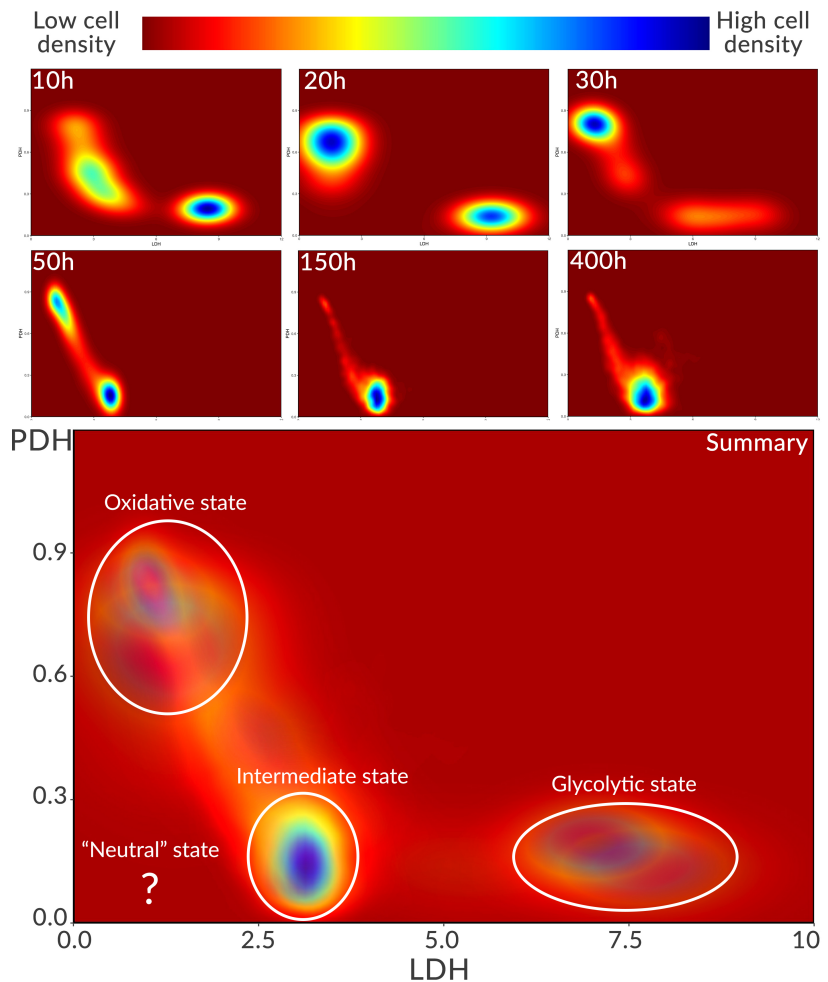


FIGURE 4.11 – Évolution du paysage métabolique du tissu de la simulation 1 au cours du temps. Les cartes présentent les zones de densité métaboliques (nombre de cellules), au niveau de l'expression des gènes LDH et PDH. Les zones rouges sont des zones où très peu de cellules se trouvent à l'inverse des zones bleues qui en regroupent une importante quantité. La carte présentée en bas est l'agrégation du paysage métabolique dans le temps, accumulant les zones de fortes densités. Les cercles blancs délimitent ces zones. La zone "neutre" est la seule zone qui n'apparaît pas sur cette carte.

Au cours de la simulation 1, les cellules se déplacent au sein de trois des quatre zones décrites précédemment (figure 4.11). Au début de la simulation les cellules se dirigent vers deux zones assez bien déterminées : la zone glycolytique en bas à droite du paysage (LDH fortement exprimé) et vers la zone oxydative en haut à gauche (PDH plus exprimé). La répartition observée précédemment sur la figure 4.9, entre phénotype fermentatoire et respiratoire est ici, bien nette (particulièrement à 20 h de simulations). L'acidification du milieu couplée à l'oxygène encore globalement bien présent à 30 h, entraîne la transition d'une grosse partie de la population cellulaire dans un mode momentanément plus oxydatif pendant

une vingtaine d'heure. La figure 4.12 présente cette transition plus clairement.

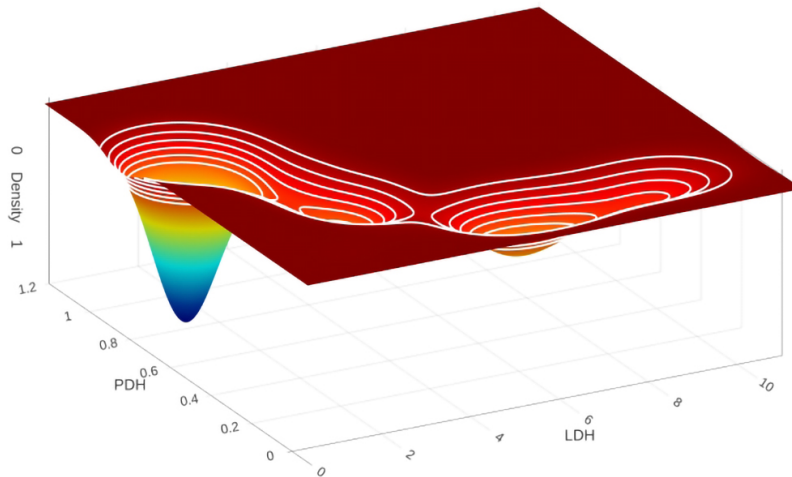


FIGURE 4.12 – Répartition de la densité cellulaire dans la bifurcation LDH/PDH de la simulation 1 à 30 h. Les lignes blanches, représentent les lignes de même densité au sein du paysage métabolique.

Cependant, rapidement, la croissance du tissu entraîne une déplétion importante d'oxygène, qui ne permet plus de maintenir l'expression de PDH aussi haute. À partir de 50 h, les cellules coincées entre le manque d'oxygène et l'acidité croissante sont poussées vers un mode hybride entre le mode "intermédiaire" et le mode "neutre" de la publication originale. Cette tendance générale se maintient jusqu'à la fin de la simulation et la transition entre le phénotype oxydatif des cellules en périphérie et le mode intermédiaire est clairement visible.

4.2 Oscillations d'oxygène

Les cellules cancéreuses sont souvent exposées à des cycles d'hypoxie notamment engendrés par un réseau vasculaire complexe et en perpétuelle reconfiguration [76]. Des expériences pour montrer l'effet de ces variations ont été menées avec des tissus exposés de manière intermittente à des tensions d'oxygène allant de 10 mmHg à 60 mmHg (certaines jusqu'à 160 mmHg mais ces valeurs ne sont pas physiologiques) [193]. Ces oscillations peuvent avoir des fréquences très rapides (inférieures à une heure), intermédiaires (dizaines d'heures) ou lentes (supérieures à un jour)[76, 193]. Il est intéressant de regarder les répercussions de telles oscillations d'oxygène sur le métabolisme et de regarder la capacité des cellules à s'adapter plus ou moins rapidement à ces changements. Pour cela trois simulations sont réalisées à partir des conditions présentées dans la simulation de référence. Cependant, ici l'oxygène aux bords de l'environnement est successivement fixé à concentration élevée (70 mmHg) puis en chutant d'un coup, à concentration faible (15 mmHg) conformément aux niveaux d'oxygénations tels que

[193]: [BADER et al. \(2020\)](#), « Cyclic Hypoxia : An Update on Its Characteristics, Methods to Measure It and Biological Implications in Cancer »

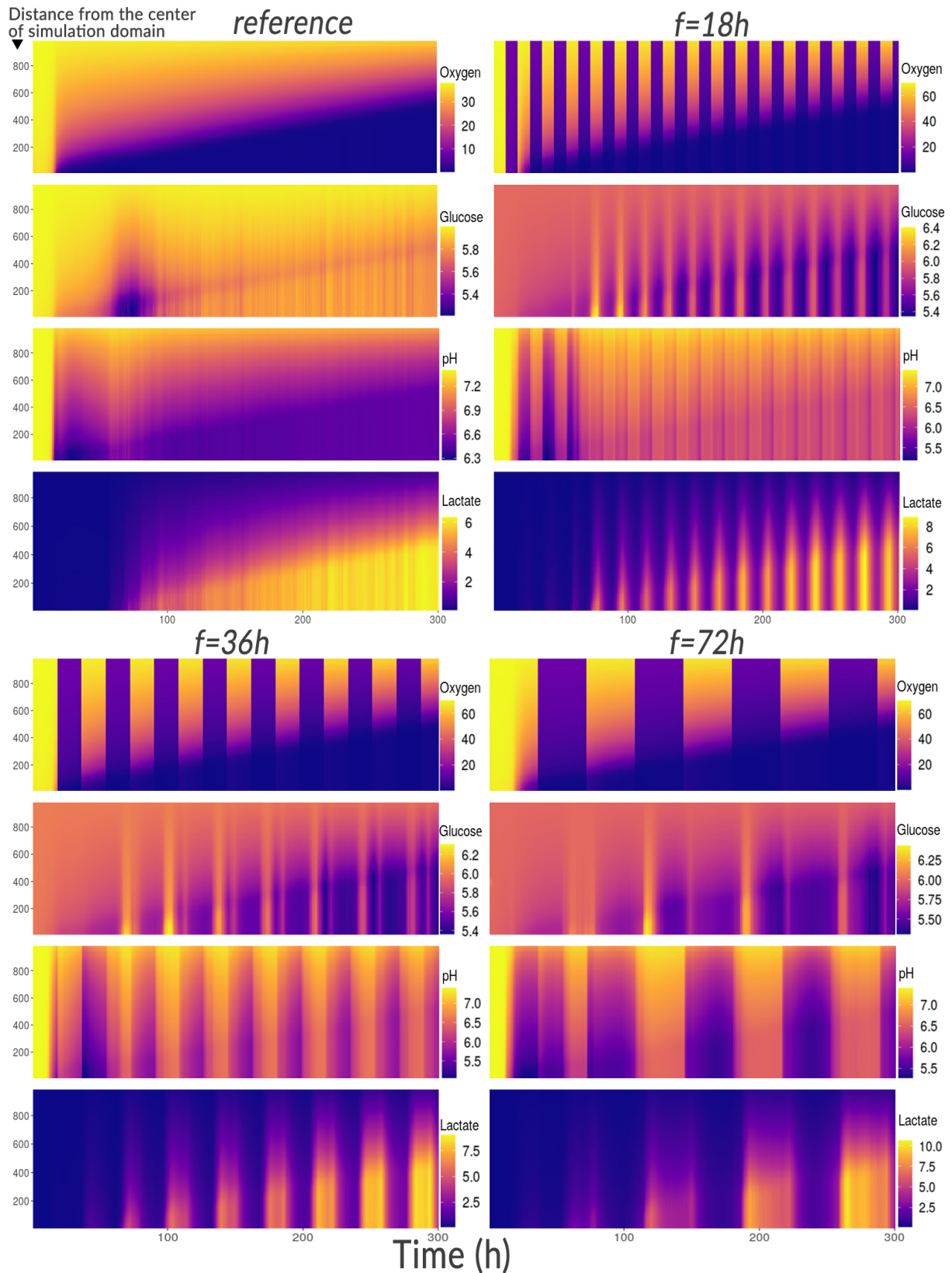


FIGURE 4.13 – Profils radiaux moyens des concentrations en substrats et pH dans l’environnement au cours de cycles d’hypoxies. Les cartes présentées, correspondent à trois simulations de 300h pendant lesquelles des cycles d’hypoxie de fréquence de 18, 36 et 72h sont imposés dans l’environnement. En ordonnée est renseignée la distance (en μm) depuis le centre du domaine de simulation et le code couleur indique les concentrations extracellulaires (mmHg pour l’oxygène, mM pour le glucose et le lactate et sans unité pour le pH).

définis dans les chapitres précédents. Ces valeurs sont légèrement plus élevées que les valeurs précédemment citées pour prendre en compte le gradient de déplétion s'installant dans le sphéroïde. Ces successions d'états normoxiques et hypoxiques sont effectués cycliquement à fréquence de 18, 36 et 72 heures (chaque état durant alors 9, 18 et 36 heures). Les autres paramètres de la simulation aussi bien extracellulaires qu'intracellulaires sont identiques à la simulation de référence.

La figure 4.13 présente les changements engendrés par ces oscillations dans l'environnement du sphéroïde. Globalement les oscillations engendrent les mêmes tendances que la simulation de référence dans l'évolution des fronts de déplétions pour l'oxygène et le lactate. Que cela soit pour des oscillations de 18, 36 ou 72 heures, ces fronts de déplétion progressent de la même manière ce qui sous-tend une croissance similaire du sphéroïde. Cependant, les concentrations qui les définissent n'ont pas les mêmes valeurs. L'oxygène étant imposé cycliquement, il alterne bien entendu entre ses bornes de variation, le lactate lui s'accumule à des concentrations légèrement plus élevées (entre 8 et 10 mM avec oscillations contre 6 mM sur la simulation de référence).

Ces hausses de lactate sont synchrones avec les chutes d'oxygène et durent le temps de ces périodes hypoxiques. Le pH quant à lui ne suit pas tout à fait le même profil que la simulation de référence. Également synchrones avec les chutes d'oxygène, le pH cependant réaugmente lorsque l'oxygène diminue et plus la fréquence d'oscillation est basse, plus la diminution du pH est importante et se maintient dans le temps. Cela semble être incohérent vis-à-vis du métabolisme des cellules. Alors que le lactate augmente lorsque l'oxygène est diminué (signe de l'intensification de la fermentation), le pH extracellulaire devrait également diminuer (le lactate ne sortant normalement de la cellule que par l'excrétion de protons).

Pour comprendre ce qu'il se passe, le profil du glucose donne des indications. Lorsque l'oxygène dans l'environnement est diminué, le glucose après un court laps de temps (environ 6 h) semble augmenter d'un seul coup (au-delà parfois de la concentration aux bords) pour diminuer à nouveau pendant tout le reste de la phase hypoxique (intensification de la fermentation). Ce que montre cette hausse momentanée du glucose est la mort synchrone d'une certaine quantité de cellules qui relâchent leur contenu dans l'environnement. Les cellules étant moins acides que l'extérieur, leur mort fait augmenter le pH extracellulaire et augmente également la concentration de lactate et de glucose. Lorsque les cellules bénéficient à nouveau d'oxygène, le pH diminue et le lactate également un peu plus tard.

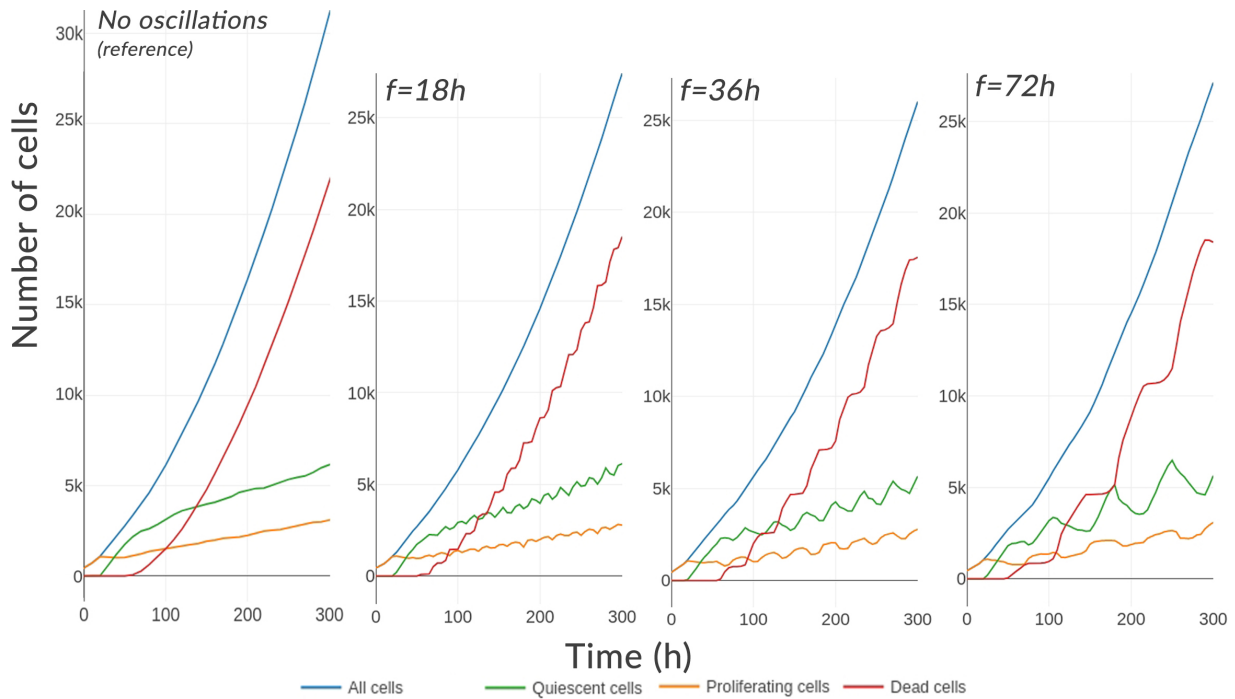


FIGURE 4.14 – Évolution de la population cellulaire dans le sphéroïde au cours de cycles d'hypoxies.

Les profils de croissance cellulaire des sphéroïdes correspondant à chaque cycle (figure 4.14) confirment les épisodes de morts cycliques. Bien que la vitesse globale de croissance ne soit pas réellement modifiée entre la simulation de référence et les simulations de déplétion d'oxygène, la population cellulaire va suivre les oscillations d'oxygène. Ainsi, plus la fréquence d'oscillation est basse et les temps d'hypoxie longs, plus la population cellulaire (principalement les cellules quiescentes plus sensibles à ces variations) va varier de manière importante tout en conservant une trajectoire commune à la simulation de référence. En réalité, les oscillations d'oxygène ne font que précipiter la mort de groupes de cellules de manière synchrone, cellules qui seraient sans doute mortes dans la simulation de référence dans les heures suivantes de manière asynchrone. Il peut être noté, une légère différence du nombre de cellules totales en fin de simulation sans oscillations expliquée par un nombre de cellules mortes plus élevé (les cellules ne bénéficiant pas de sursauts d'oxygène et les gradients engendrés tendant plus facilement vers une hypoxie durable), mais cette différence ne change pas le nombre de cellules encore en vie.

Les phénotypes associés à ces variations sont maintenant évalués. La figure 4.15 trace au cours du temps, la proportion de chaque phénotype dans la population des cellules encore en vie (somme des courbes vertes et oranges de la figure 4.14). Pour cela, le nombre de cellules associé à chaque phénotype est divisé par le nombre de cellules en vie. En début de simulation le métabolisme des cellules se stabilise entraînant des variations visibles aussi bien

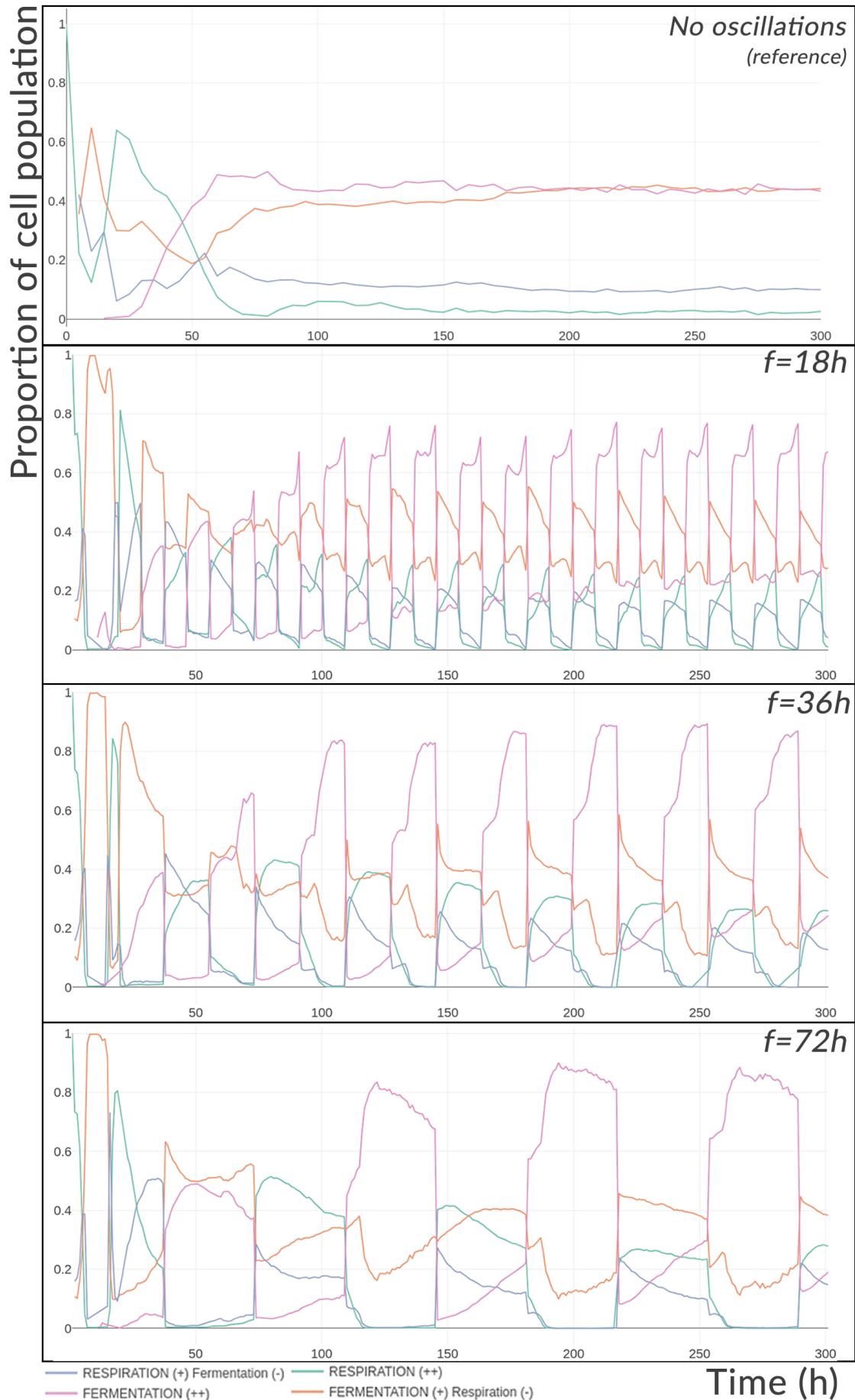


FIGURE 4.15 – Évolution de la proportion des phénotypes métaboliques dans le sphéroïde avec ou sans cycles d'hypoxies. Lorsqu'un phénotype est décrit avec un (-) cela signifie qu'il est présent mais en proportion plus faible que celui marqué par un (+).

dans la simulation de référence que dans les autres. Lorsque les cellules sont initiées au début de simulation leurs concentrations internes ne correspondent pas tout à fait aux concentrations idéales imposées par les contraintes de l'environnement. Elles ont donc besoin de quelques heures pour converger vers les attracteurs métaboliques les plus proches. L'ajout d'oscillations d'oxygène retarde légèrement ce processus mais les comportements métaboliques se stabilisent rapidement et sont clairement identifiables au bout d'une cinquantaine d'heure.

Ainsi, la fermentation est le phénotype dominant de la population cellulaire en période hypoxique avec entre 75% (pour la fréquence d'oscillation la plus haute) et 90% (pour la fréquence d'oscillation la plus basse) d'utilisation. À l'inverse, le mode hybride "Fermentation (+) Respiration (-)" est majoritaire en période d'oxygénation (entre 40% et 55%). On peut tout même noter une baisse progressive de l'utilisation de la respiration (majoritaire au départ en période d'oxygénation) au sein de la population quelle que soit la simulation considérée due à l'accroissement de la taille du tissu et la consommation plus importante d'oxygène par le tissu qui en découle. Il faut cependant garder en mémoire que cette segmentation des phénotypes sert avant tout à catégoriser des groupes cellulaires et les transitions entre états étant continues, le mode présenté comme majoritaire "Fermentation (+) Respiration (-)" utilisant un peu plus la fermentation que la respiration n'est pas très différent du mode "Respiration (+) Fermentation (-)". Il est intéressant de constater que la répartition des phénotypes énergétiques cellulaires ne varie pratiquement pas d'un cycle à l'autre. Cette conservation du comportement oscillatoire montre la capacité d'adaptation du métabolisme (au moins à court terme) à la variation d'oxygène.

La traduction de ces phénotypes par l'effet Warburg et Warburg inverse est présentée sur la figure 4.16. Le premier cadre rappelle la répartition de l'expression de l'effet Warburg dans la simulation de référence. Environ 18% des cellules expriment l'effet Warburg (suivant la définition moderne correspondant à l'excrétion de lactate en situation d'hypoxie). Si l'on se focalise sur les autres cellules excrétant du lactate (hors hypoxie) la proportion se stabilise aux alentours de 80% et représente la majorité du tissu. Ainsi 98% des cellules excrètent du lactate. Dans les simulations d'oscillations d'oxygène les tendances de la simulation de référence lissées au cours du temps sont encore globalement conservées. Cependant, localement les oscillations permettent de faire varier grandement l'expression de l'effet Warburg. Plus la fréquence d'oscillation est basse plus l'amplitude de variation d'expression de l'effet Warburg est élevée. Lorsque les cycles sont longs, les cellules ont plus de temps pour converger vers un attracteur métabolique et engendre

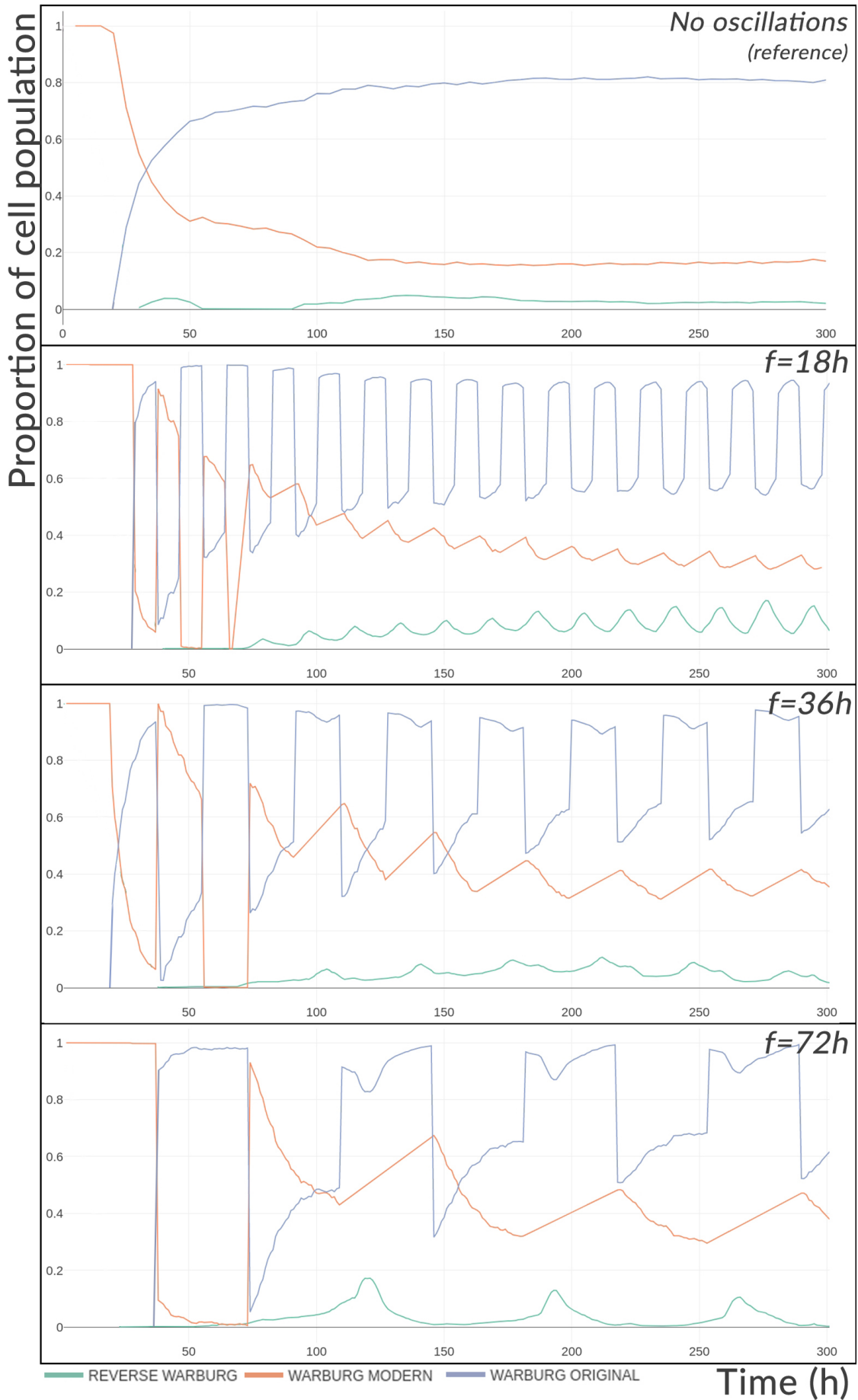


FIGURE 4.16 – Évolution de la proportion d’effet Warburg et Warburg inverse dans le sphéroïde avec ou sans cycles d’hypoxies.

donc des variations plus marquées lors de changements.

Le cycle de 72 h notamment, créant de plus longs moments de fermentation, engendre plus de lactate mais a également plus de temps pour laisser l'effet Warburg inverse se produire lors des phases de réoxygénation et revenir à son niveau d'origine. Au contraire, le cycle le plus court de 18 h, crée un peu moins de lactate mais voit l'activité basale du Warburg inverse légèrement augmenter, la fréquence plus élevée d'oscillation laissant moins de temps à la cellule pour équilibrer sa concentration intra- et extracellulaire de lactate. Ainsi l'effet Warburg inverse peut représenter à certains instants, 19% de l'expression métabolique du tissu soit autant que l'expression basale d'effet Warburg (définition moderne) de la simulation de référence.

4.3 Chocs acides

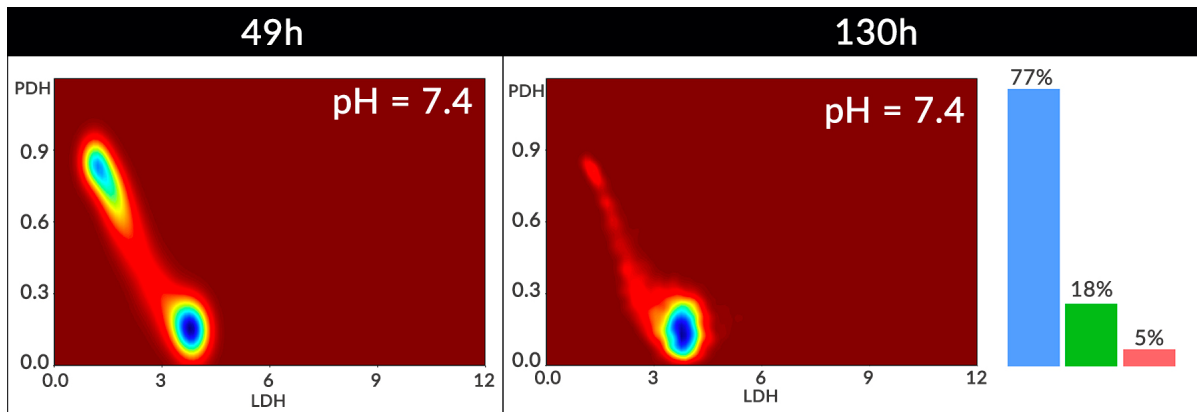
Maintenant, au lieu d'effectuer des cycles d'hypoxies, les sphéroïdes sont soumis à des chutes brutales du pH extracellulaire afin de tester les conséquences sur le métabolisme d'une exposition soudaine à l'environnement acide rencontrée au sein des tumeurs. Pour cela, l'environnement entier (pas seulement les bords) est maintenu à pH physiologique (= 7.4) pendant 50 h puis à partir de la cinquantième heure, il est maintenu à des pH inférieurs ou égaux au pH physiologique.

Ces simulations reproduisent le cœur des expériences *in vitro* effectuées dans notre équipe dans lesquelles les sphéroïdes baignent dans des solutions tampons à pH physiologique et après un certain temps, de la même manière, dans des solutions tampons à pH plus acide. L'évolution des sphéroïdes est alors observée sur des temps relativement courts pour évaluer leur survie et leur capacité de régulation de l'acidité.

La figure figure 4.17, présente les résultats de ces simulations. Le premier cadre rappelle la simulation de référence dans laquelle le pH n'est imposé qu'aux bords et évolue librement dans le reste du domaine de simulation. Le second cadre présente les quatre pH testés : 7.4 (le pH n'est pas changé et est maintenu dans tout l'environnement à pH physiologique), 6.7, 6.0 et 5.3. Le paysage métabolique est tracé avant le changement d'acidité à 50 h et après au bout de 130 h. Ici il n'y a pas d'oscillations et le paysage métabolique converge vers ceux présentés.

La première observation qui peut être faite avant les changements de pH est la différence entre l'environnement à pH imposé sur les bords et celui à pH imposé partout. Lorsque le pH n'est imposé

pH imposed on borders only



pH imposed everywhere

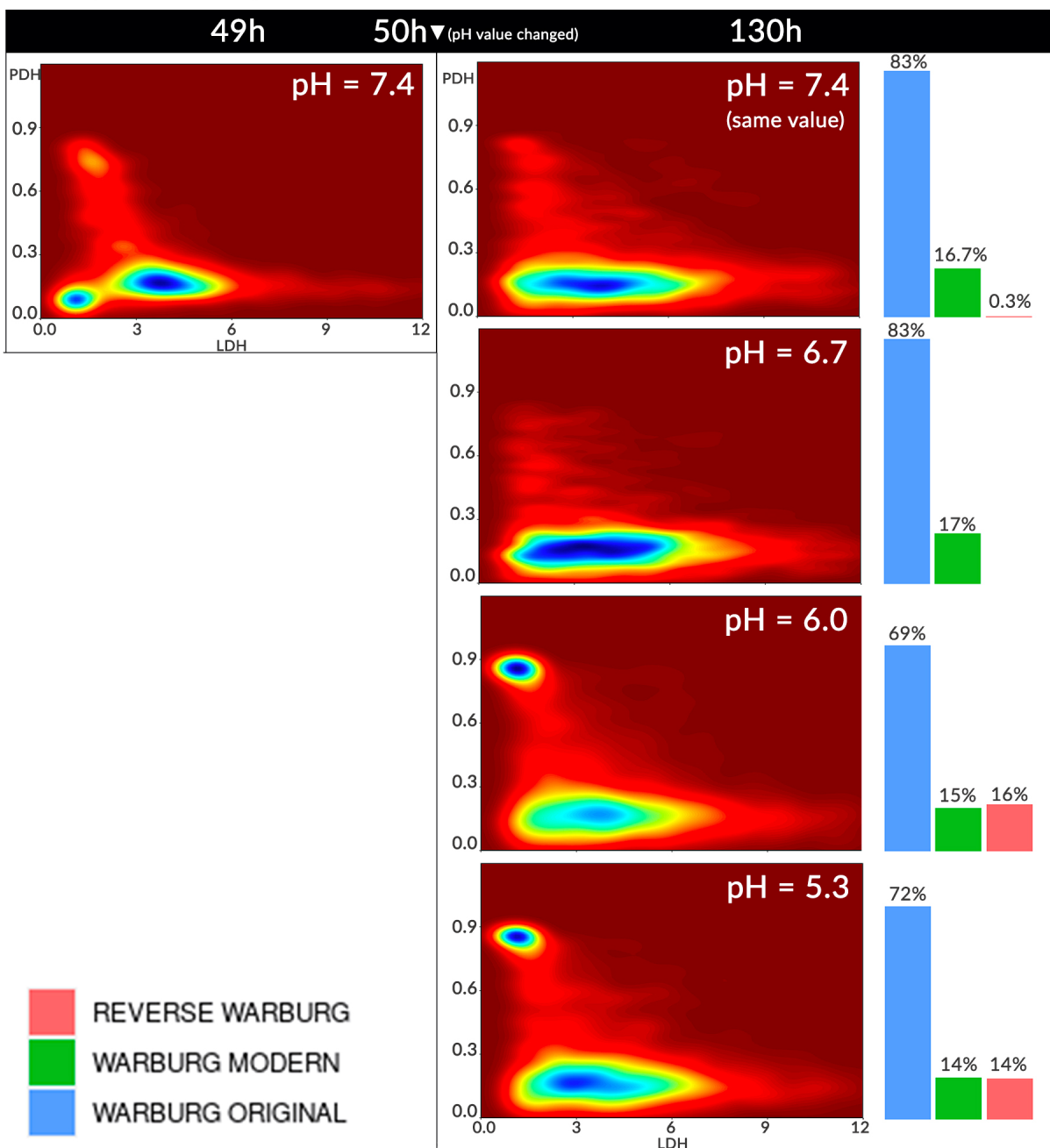


FIGURE 4.17 – Paysages métaboliques et expression de l'effet Warburg avant et après le changement de pH dans l'ensemble de l'environnement. La situation "pH imposés seulement sur les bords" correspond à la simulation de référence.

qu'aux bords, le pH devient de plus en plus acide au cœur du sphéroïde à mesure que le glucose est consommé et le lactate excrété avec des protons. Ceci réduit la capacité fermentatoire des cellules qui sont majoritairement localisées dans la zone intermédiaire du paysage (définie aux alentours de $LDH \approx 4$ et $PDH \approx 0.1$). Une partie des cellules (celles ayant plus accès à l'oxygène) continue d'utiliser un peu plus la respiration dans la zone oxydative du paysage (0.9, 1.0). Au contraire, lorsque le pH est imposé partout dans l'environnement, les cellules majoritairement dans le mode intermédiaire, couvrent également un plus grand espace du paysage métabolique et laissent entrevoir une répartition entre ses quatre attracteurs ("neutre", "intermédiaire", "oxydatif" et "glycolytique"). Le mode glycolytique est le moins exprimé au niveau du paysage mais n'est pas absent.

À 130 h, la simulation de référence indique, que la majorité des cellules se sont centralisées au niveau de la zone intermédiaire, les quelques cellules bénéficiant d'un peu plus d'oxygène finissant progressivement par transiter vers cette zone à mesure que le tissu croît et l'oxygène disponible par cellule diminue. Ce comportement est retrouvé à 130 h et à pH fixé avec cependant un élargissement de la zone intermédiaire. Les cellules peuvent être plus glycolytique, l'acidité étant soit moins forte (lorsque le pH demeure entre 6.7 et 7.4) soit établi depuis moins longtemps (depuis seulement $t=50$ h) que la simulation de référence. En descendant en acidité cependant, entre le pH 6.7 et 6.0, (visible dans les paysages à partir de pH 6.0), une focalisation des cellules dans la zone oxydative réémerge clairement, le pH étant ici suffisamment bas pour certaines cellules pour inhiber la glycolyse et la quantité de lactate accumulée suffisante pour introduire l'effet Warburg inverse. C'est d'ailleurs à partir de ces pH que l'effet Warburg inverse atteint la même proportion (environ 15%) que les cellules excréant du lactate alors que l'oxygène est insuffisant (effet Warburg par sa définition moderne).

Ici le pH a un double effet. En étant identique partout il permet dans un premier temps aux cellules d'explorer une zone métabolique plus large et plus permissive. L'atteignabilité de ces zones est alors directement liée à l'accès aux substrats principaux que sont l'oxygène et le glucose. Dans un second temps, à pH plus acide il a un rôle inhibiteur de la glycolyse. Que cela soit par une forme de rétroaction négative (dans le cas où c'est la fermentation qui est responsable de la baisse du pH), ou que cela provienne d'une imposition du pH dans l'environnement, le résultat est le même, la fermentation est altérée.

C'est également ce que montre la figure 4.18. Lorsque le pH est maintenu dans tout l'environnement et particulièrement à pH 7.4, la fermentation se maintient plus facilement que dans la simulation

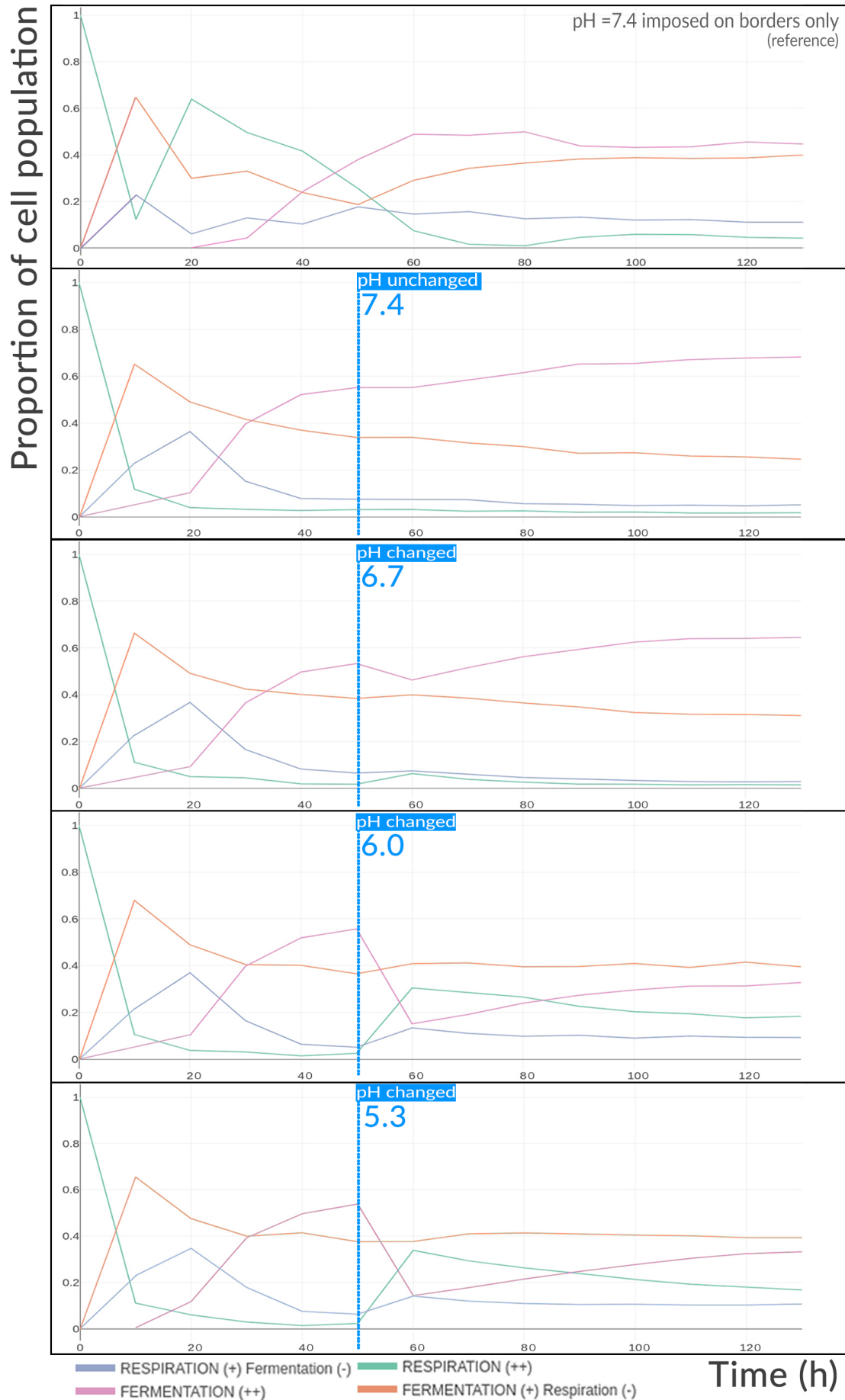


FIGURE 4.18 – Évolution de la proportion des phénotypes métaboliques dans la population des sphéroïdes au cours du temps avant et après le changement de pH dans l'ensemble de l'environnement.

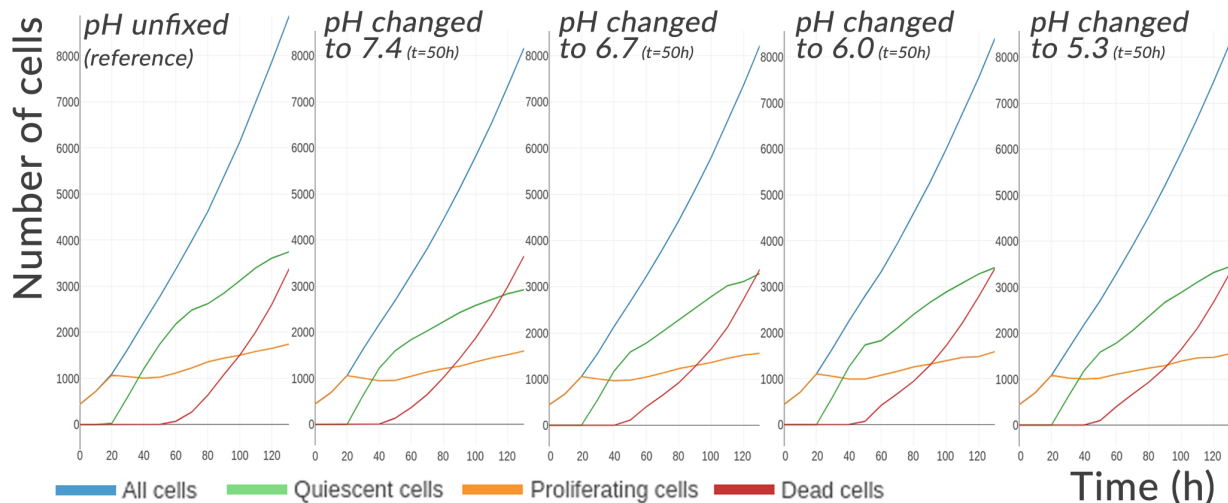


FIGURE 4.19 – Évolution des états cellulaires au sein de la population des sphéroïdes au cours du temps avant et après le changement de pH dans l'ensemble de l'environnement.

de référence, l'acidité n'inhibant pas la glycolyse. Avant 50 h, la répartition des phénotypes est bien identique et dévie après le changement de pH, principalement pour les pH les plus acides (6.0 et 5.3). À pH 6.7, on observe une très légère chute de la proportion de cellules fermentatoires par rapport au pH maintenu à 7.4, et se rehausse à nouveau au même niveau que celle-ci. Cette trajectoire pour le métabolisme fermentatoire est associée à la trajectoire contraire pour le métabolisme respiratoire qui augmente très légèrement pour diminuer ensuite. À pH 6.0 et 5.3, la respiration et le phénotype hybride "Respiration (+) Fermentation (-)" sont plus fortement augmentés, le taux de respiration dans le tissu atteignant pratiquement le même taux que le phénotype hybride "Fermentation (+) Respiration (-)" à 60 h. Parallèlement la proportion de cellules essentiellement respiratoires descend d'environ 35%.

Ensuite au fil des heures qui suivent, la répartition des différents phénotypes tend à nouveau s'inverser. La fermentation remonte et la respiration diminue, sans néanmoins atteindre les taux observés à pH physiologique. La raison de ce rebond est la même que celle pour la figure 4.17 : la chute progressive d'oxygène accessible par les cellules des couches plus profondes du sphéroïde en croissance. Le glucose est ici en excès comparativement à la quantité d'oxygène disponible et les cellules ont l'avantage de stocker le glucose. En l'absence d'oxygène, et malgré des pH acides, la fermentation augmente mais en activité réduite.

Le nombre de cellules et la répartition des états cellulaires ne semblent pas réellement changer avec le pH (figure 4.19). On peut noter que le profil à pH fixé à 5.3 est plus proche de la simulation de référence à 130 h, avec un peu moins de mort cellulaire et légèrement plus de cellules quiescentes que les profils aux pH

plus élevés. Les courbes du nombre de cellules en quiescence et mortes finissent tôt ou tard par se croiser mais ce qui change c'est la cinétique. Sans nécessairement savoir si cette différence est significative et a du sens, le fait est que la simulation à pH plus acide est aussi la simulation la plus proche de la simulation de référence au niveau de la répartition des phénotypes à 130 h. Globalement, ce qu'indique ces résultats, là encore, c'est l'élasticité du métabolisme qui reste stable tout en convergeant vers des zones métaboliques permettant aux cellules de survivre à ces chocs acides. Ni la prolifération, ni la quiescence ne semblent réellement favorisées par ces chocs acides à court terme.

4.4 Déplétion de glucose

De la même manière que cela a été fait pour le pH, la simulation suivante a pour objectif de regarder les conséquences d'une déplétion de glucose sur la tumeur. Dans le modèle, en dehors de l'oxygène, le glucose (et le lactate) sont les seules sources externes permettant de régénérer les niveaux de pyruvate ou d'acétyl-CoA. Comme précisé dans les chapitres précédents, ici pas d'acide gras ou de glutamine. L'idée dans cette simulation est de regarder l'évolution du métabolisme privé de sa source principale de carbone.

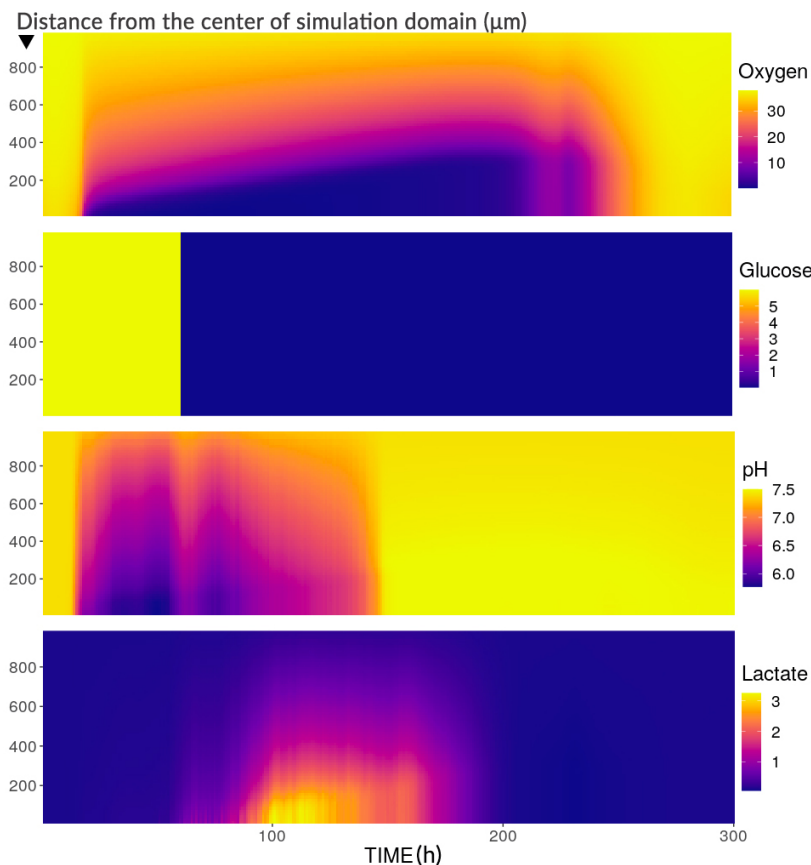


FIGURE 4.20 – Profils radiaux moyens des concentrations en substrats dans l'environnement avant et après déplétion de glucose à 60 h. En ordonnée est renseignée la distance depuis le centre du domaine de simulation et le code couleur indique les concentrations extracellulaires (mmHg pour l'oxygène, mM pour le glucose et le lactate et sans unité pour le pH).

Le sphéroïde de cette nouvelle simulation croît dans les mêmes conditions que la simulation de référence avec cependant la concentration de glucose fixée à 6.0 mM dans l'ensemble de l'environnement (pas seulement aux bords). Le gradient de glucose introduit dans la simulation de référence avant 60 h étant négligeable, il est possible de maintenir le glucose à concentration constante avant. Au bout de 60 h, la concentration de glucose est réduite à 0.01 mM dans l'ensemble de l'environnement et maintenue telle quelle. Cette chute est visible sur la figure 4.20. La simulation dure 300 h au total. Elle est plus longue que la simulation sur le pH présentée au-dessus, car les effets de la déplétion du glucose mettent plus de temps à émerger.

Contrairement aux simulations précédentes, ici pour l'oxygène, le pH et le lactate, la progression de leur empreinte radiale n'est pas linéaire. Le pH, acide, redevient physiologique vers 150 h. Le lactate atteint sa concentration la plus élevée à 100 h (environ 3 mM) et redescend jusqu'à quasiment 0 mM peu avant à 200 h. La déplétion d'oxygène progresse comme précédemment jusqu'à 230 h, et après une petite réaugmentation de sa concentration immédiatement suivi vers 240 h d'un épisode court de déplétion, l'oxygène revient durablement à sa concentration d'origine de 38 mmHg.

La figure 4.21 donne quelques éclaircissements sur ce qu'il se passe. Les états cellulaires et le nombre de cellules ne dévient pratiquement pas de ceux de la simulation de référence avant 150 h. C'est à partir de ce moment qu'il y a une baisse du nombre de cellules prolifératives et quiescentes. Cette baisse se poursuit pour les cellules prolifératives jusqu'à 200 h, au profit du nombre de cellules quiescentes qui augmente. Le nombre de cellules mortes se stabilise momentanément et réaugmente vers 230 h, alors que le nombre de cellules quiescentes diminue rapidement. Le sursaut d'oxygène observé entre 230 et 240 h sur la figure 4.20, correspond à cette baisse des cellules quiescentes combinée à la hausse très faible et momentanée du nombre de cellules prolifératives qui diminue ensuite jusqu'à la fin de la simulation ne laissant qu'une centaine de cellules encore en vie.

Ainsi du point de vue de la croissance tumorale, le tissu n'a pas été perturbé immédiatement après la chute du glucose, la perturbation n'est survenu que 80 heures plus tard. La raison provient du délai entre déplétion du glucose dans l'environnement et déplétion intracellulaire. Là où la pression en oxygène intracellulaire s'équilibre avec la pression extracellulaire par diffusion simple, la concentration de glucose intracellulaire ne s'équilibre que par diffusion facilitée [194] qui, bien que plus rapide que la diffusion simple, dépend du nombre de transporteurs membranaires GLUT. Il y a donc un temps pendant lequel, le glucose sort de la

[194]: NAVALE et al. (2016), « Glucose transporters : physiological and pathological roles »

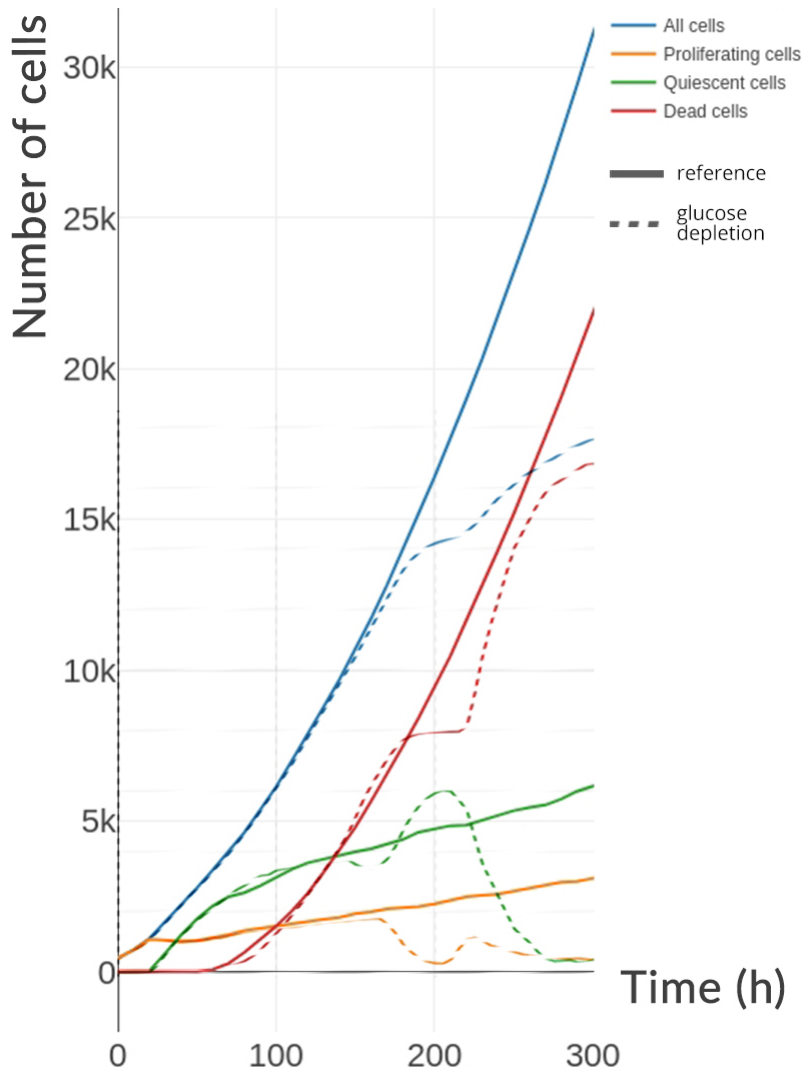


FIGURE 4.21 – Évolution des états cellulaires au sein de la population des sphéroïdes au cours du temps avant et après la chute de glucose dans l'ensemble de l'environnement. La simulation de chute du glucose (traits en pointillés) est mise en parallèle avec la simulation de référence (traits pleins). La déplétion de glucose a lieu à partir de 60 h.

cellule (sans augmenter la concentration extracellulaire, celle-ci étant maintenue fixe à chaque pas de temps) et est en même temps consommé par la même cellule au travers de la glycolyse. Il s'agit en quelque sorte du temps pour épuiser ses réserves.

Ensuite, le glucose intracellulaire chutant, le pyruvate est de moins en moins produit par glycolyse mais sa concentration doit être maintenue pour conserver une production d'énergie suffisante. Le lactate produit jusqu'alors par fermentation est lui aussi consommé. Sa déplétion intracellulaire elle aussi résulte à la fois de sa vitesse de consommation (transformation en pyruvate) et de la déplétion de lactate dans l'environnement. Ainsi un peu avant 200 h, la quasi-totalité du lactate extracellulaire a été réintroduit dans les cellules entraînant en même temps une remontée du pH et à partir de 210 h le lactate intracellulaire dans la majorité des cellules est consommé (non montré). La respiration ne peut alors plus avoir lieu et l'oxygène qui n'est plus utilisé par les cellules remonte progressivement. Les cellules ne produisant plus suffisamment

d'ATP meurent pour la plupart. Il reste quelques cellules encore en vie qui bénéficient soudainement d'une oxygénation idéale, du peu de glucose encore présent et de la mort des cellules voisines qui libèrent les restes de glucose et de lactate de leur cytoplasme dans l'environnement.

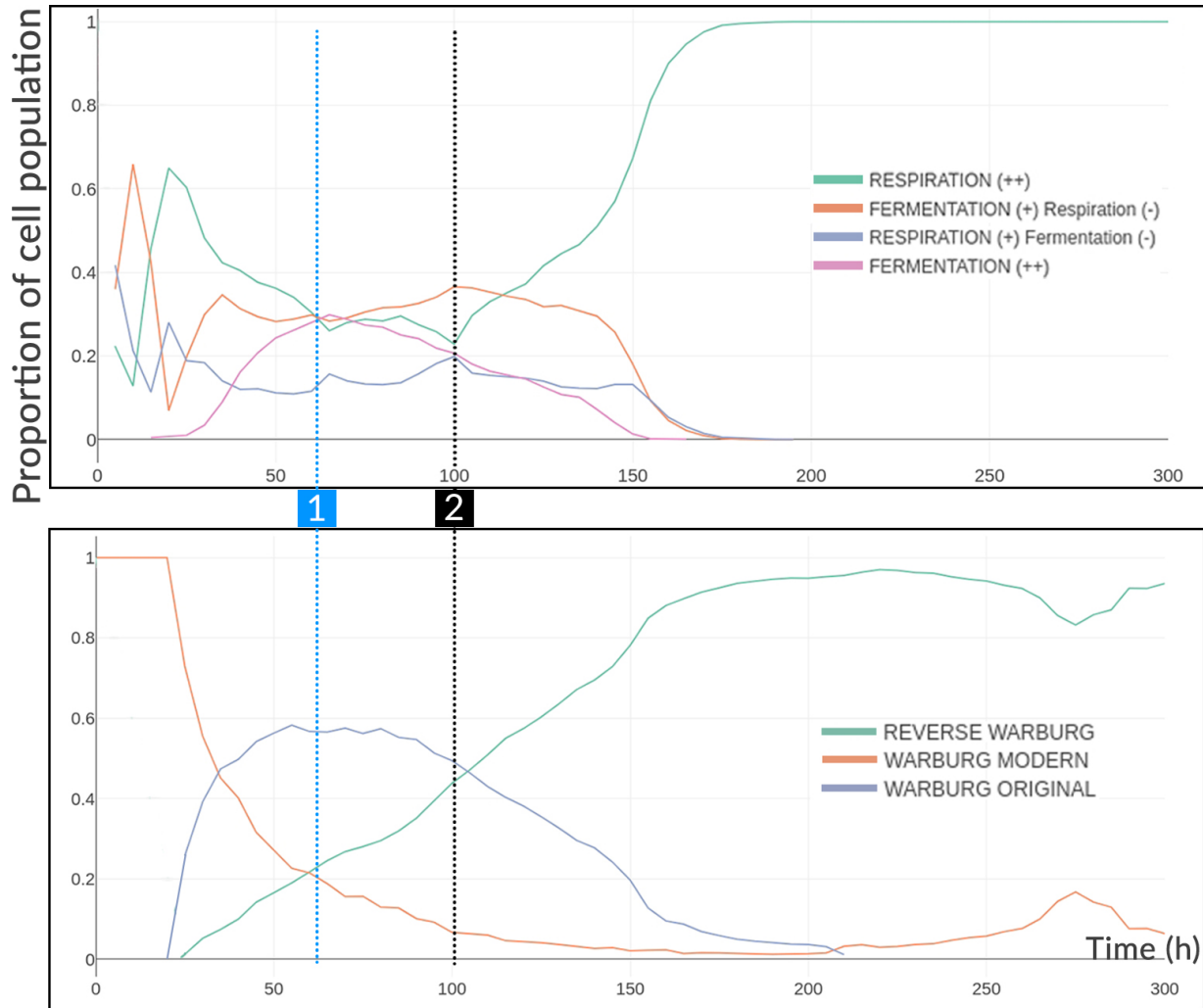


FIGURE 4.22 – Évolution de la proportion des phénotypes métaboliques et de l'expression de l'effet Warburg dans la population cellulaire au cours du temps avant et après la baisse de concentration en glucose dans l'ensemble de l'environnement. 1) A 60 h, le glucose extracellulaire est fixé dans l'ensemble de l'environnement à 0.01 mM. 2) A 100 h, le glucose intracellulaire des cellules a atteint la concentration extracellulaire.

La figure 4.22 confirme les délais survenant dans les réponses métaboliques à la déplétion de glucose. Avant 60 h, les phénotypes et l'expression de l'effet Warburg sont quasiment identiques à la simulation de référence (figure 4.16) avec cependant une hausse légèrement plus forte de l'effet Warburg inverse en raison de la quantité de lactate s'accumulant plus rapidement au sein des cellules (en raison de l'absence de gradient). Après 60 h, les proportions ne changent pas vraiment mis à part la fermentation ("Fermentation (++)") qui commence à décroître en même temps que le glucose intracellulaire et l'effet Warburg inverse qui continue d'augmenter.

À partir de 100 h, lorsque la concentration de glucose intracellulaire a atteint la concentration extracellulaire, le taux de respiration s'infléchit et commence à croître pour devenir à 180 h le mode de fonctionnement quasiment unique des cellules. Du point de vue de l'effet Warburg, il se maintient plus longtemps que ne le fait la fermentation, les niveaux de lactate intracellulaire continuant à s'équilibrer avec l'extérieur, le lactate étant parfois excrété. Cela montre aussi le fait que l'effet Warburg n'est pas toujours induit par l'activité fermentatoire concomitante.

4.5 Complexité des comportements émergents

Dans cette section l'hétérogénéité du métabolisme sera abordée au travers de simulations variant plusieurs paramètres simultanément. Ces simulations ont pour objectif de caractériser les conditions nécessaires pour faire converger les cellules en des endroits spécifiques du paysage métabolique. Il s'agit d'un processus difficilement automatisable car quand bien même il est tout à fait possible théoriquement d'effectuer de nombreuses simulations pour tester chaque combinaison de paramètres et de variables du modèle, cela demande un coût en calcul trop élevé à l'heure actuelle. De plus, le problème en procédant ainsi est qu'il serait nécessaire pour analyser ces résultats à grande échelle de moyenner le comportement cellulaire des tissus risquant alors de passer à côté de leur morphologie ainsi que du sens et de la significativité des phénomènes spatiotemporels observés.

Pour simplifier le problème, les variables modifiées comme précédemment au début des simulations seront restreintes à l'oxygène, au glucose et au lactate extracellulaires ainsi qu'à la variance des forces de régulations des gènes (paramètres γ). La synthèse des observations manuelles sur de nombreuses simulations sera détaillée et certaines d'entre elles intéressantes au regard de la complexité des comportements émergents seront présentées.

4.5.1 Complexité morphologique

Au cours des simulations se sont dégagées trois types de morphologies tissulaires :

- Sphéroïde à cœur nécrotique (déjà présenté dans la simulation de référence figure 4.3)
- Sphéroïde plein (simulation 2; figure 4.23)
- Sphéroïde à bourgeons (simulation 3 et 4; figure 4.24, figure 4.25)

TABLE 4.3 – Paramètres généraux de la simulation 2 (Rappel de la table 4.1)

N°	2
Type	2D
Nb. initial	48
Nb. final	71 000
Durée (h)	570
O ₂ (mmHg)	38.0
Glucose (mM)	6.0
Lactate (mM)	10
pH	7.4

TABLE 4.4 – Paramètres généraux de la simulation 3 et 4 (Rappel de la table 4.1)

N°	3 & 4
Type	2D
Nb. initial	440
Nb. final	35000 & 17500
Durée (h)	695 & 707
O ₂ (mmHg)	16.5 & 9.22
Glucose (mM)	6.0
Lactate (mM)	0-N
pH	7.4

Les sphéroïdes pleins (figure 4.23), sont des sphéroïdes à forte capacité de croissance et donc le corps nécrotique n'apparaît pas ou seulement tardivement sur l'échelle de temps des simulations réalisées. Ces sphéroïdes baignent généralement dans des conditions environnementales propices à la survie des cellules, c'est-à-dire oxygène et/ou glucose en concentration importante principalement. Il est certain que cette situation ne peut pas perdurer à l'infini, à mesure que le tissu croît le gradient d'oxygène diminue et la génération d'ATP au sein du cœur du sphéroïde se fait de plus en plus difficile. Cependant, cet événement n'apparaît pas dans la fenêtre d'observation de la simulation qui est généralement arrêtée avant (bien souvent car le sphéroïde touche les bords du domaine). Leur forme est sphérique et homogène.

FIGURE 4.23 – Croissance du sphéroïde de la simulation 2. Chaque image est espacée de 50h depuis $t=0$ jusqu'à $t=400h$. La coloration est relative à chaque pas de temps et indique l'ancienneté des cellules. Plus une cellule est violette plus elle est âgée par rapport aux autres cellules.

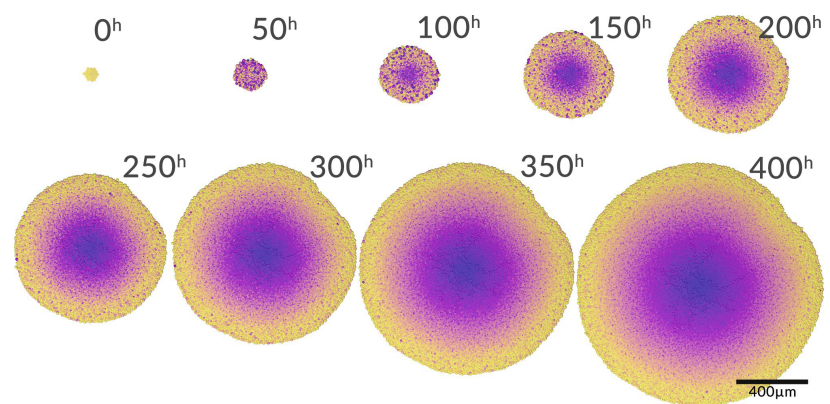
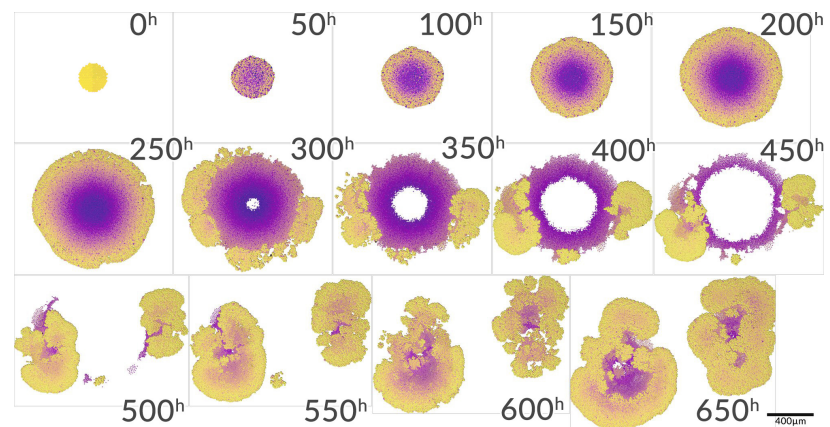


FIGURE 4.24 – Croissance du sphéroïde de la simulation 3. Chaque image est espacée de 50h depuis $t=0$ jusqu'à $t=650h$. La coloration est relative à chaque pas de temps et indique l'ancienneté des cellules. Plus une cellule est violette plus elle est âgée par rapport aux autres cellules.



Enfin, on a des sphéroïdes qu'on pourrait qualifier "à bourgeons". En effet, ces derniers ont une croissance beaucoup plus hétérogène et ont tendance à former des excroissances qui peuvent ou non donner naissance à de nouveaux tissus isolés. L'apparition de ces structures est généralement due à des conditions environnementales sévères et/ou à une mauvaise perfusion du tissu en nutriments. Les cellules n'étant pas adaptées aux conditions ne survivent pas, meurent et perturbent la symétrie radiale qui peut exister dans les autres formations tissulaires.

Dans la figure 4.24 les cellules centrales meurent rapidement et

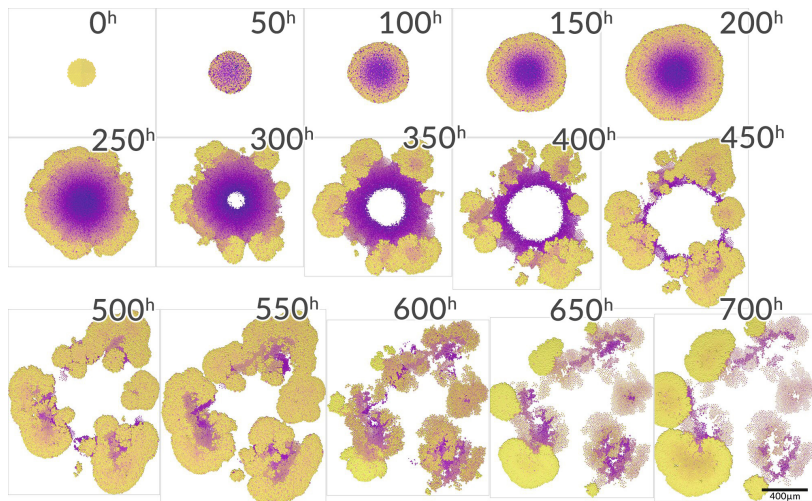


FIGURE 4.25 – Croissance du sphéroïde de la simulation 4. Chaque image est espacée de 50h depuis $t=0$ jusqu'à $t=700h$. La coloration est relative à chaque pas de temps et indique l'ancienneté des cellules. Plus une cellule est violette plus elle est âgée par rapport aux autres cellules.

seules les cellules proches des bords de la simulation (et donc de la source de nutriments) se maintiennent en vie, initiant la croissance de bourgeons qui se développent en un nouveau tissu. Sur l'avant-dernière image de la simulation, on voit néanmoins que les cellules continuent régulièrement à mourir en certains endroits, augmentant la perfusion du tissu, renouvelant ainsi cycliquement la population locale.

La figure 4.25 a les mêmes caractéristiques. Dans ces deux simulations, le lactate s'accumule et n'est pas éliminé et l'environnement est proche de l'hypoxie. Cette simulation a cependant, une concentration en oxygène environ deux fois moins élevée aux bords et pour le même temps simulé il y a deux fois moins de cellules. La diminution de l'oxygène et la baisse de la population cellulaire sont corrélées mais toutes les sources d'aléatoire (direction de division, régulation du réseau de régulation, initiation des cycles cellulaires, etc.) sont capables de générer des simulations différentes mais convergent vers des comportements communs sur plusieurs simulations. Cette configuration tissulaire n'est pas rencontrée *in vitro*, un sphéroïde étant plongé dans un puits et entouré d'eau, les cellules se regroupent en amas au fond. Mais n'ayant pas intégré la gravité ces simulations peuvent être envisagées vue de haut, comme si les cellules proliféraient sur une boîte de pétri (dans la limite des contraintes imposées par l'outil de simulation).

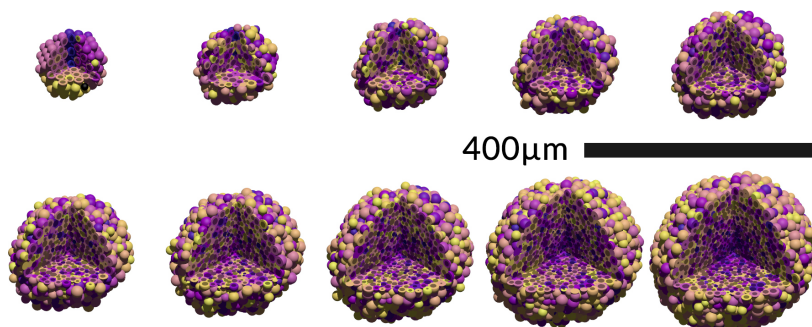
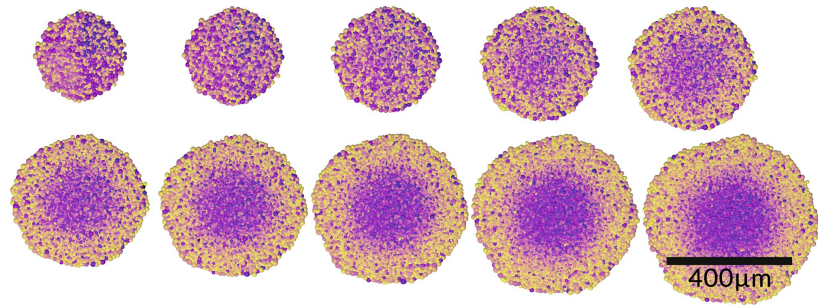


FIGURE 4.26 – Croissance du sphéroïde de la simulation 5. Chaque image est espacée de 12h depuis $t=0$ jusqu'à $t=110h$. La coloration est relative à chaque pas de temps et indique l'ancienneté des cellules. Plus une cellule est violette plus elle est âgée par rapport aux autres cellules.

FIGURE 4.27 – Croissance du sphéroïde de la simulation 5 bis. Chaque image est espacée de 12h depuis t=0 jusqu'à t=110h. La coloration est relative à chaque pas de temps et indique l'ancienneté des cellules. Plus une cellule est violette plus elle est âgée par rapport aux autres cellules.



[195]: SINGH et al. (2020), « Critical role of three-dimensional tumorsphere size on experimental outcome »

[196]: FRIEDRICH et al. (2009), « Spheroid-based drug screen : considerations and practical approach »

TABLE 4.5 – Paramètres généraux de la simulation 5 et 5 bis (Rappel de la table 4.1)

N°	5 & 5 bis
Type	3D & 2D
Nb. initial	440
Nb. final	12 000
Durée (h)	110
O ₂ (mmHg)	38.0
Glucose (mM)	5.0
Lactate (mM)	4.5-N
pH	7.5-N

Les diamètres obtenus en simulation 2D (environ 900 μm) sont dans la tranche haute des diamètres standards de sphéroïdes matures qui sont plutôt pour des glioblastomes de l'ordre de 400 à 700 μm [195]. Les tailles sont cependant du même ordre de grandeur et des sphéroïdes de 1000 μm ont déjà été obtenus expérimentalement [196].

Sur la simulation 5 (figure 4.26), en 3D (sphéroïde plein), le diamètre à 110 h de croissance est d'un peu moins de 300 μm alors qu'il est d'environ 570 μm sur la simulation 5 bis (faite en 2D) au même temps de développement et avec le même nombre de cellules. Pour rappel, les simulations en 3D, bien que tout à fait réalisables sont trop coûteuses en temps de calcul, les simulations en 2D ont donc été privilégiées (voir la sous-section Section 3.4.6).

4.5.2 Complexité métabolique

Les fins des simulations 2, 3 et 4, sur la figure 4.28 présentent les mêmes caractéristiques au niveau de la distribution des couches que la simulation de référence (1). Dans la simulation 2, les cellules sont en quiescence et réussissent à maintenir un niveau d'ATP suffisant pour leur survie. Dans cette simulation, le nombre de cellules au départ est plus petit (48) et l'oxygène commence à diminuer plus tardivement que dans la simulation de référence. Le lactate est lui, imposé aux bords à une concentration plus élevée (10 mM).

Le lactate en forte quantité dans le milieu (figure 4.29) est un frein à son export par les cellules (à cause du gradient intra/extracellulaire). De ce fait le lactate s'accumule dans les cellules et sort relativement peu. À mesure cependant que l'oxygène est de moins en moins accessible pour les couches internes du sphéroïde, la consommation de glucose augmente progressivement, le pH diminue, le maintien des niveaux en pyruvate devient problématique et le gradient protons/lactate intra/extra-cellulaire devient favorable à un import. Ainsi, le pH réaugmente, le glucose ainsi que le lactate extracellulaires sont consommés par les cellules.

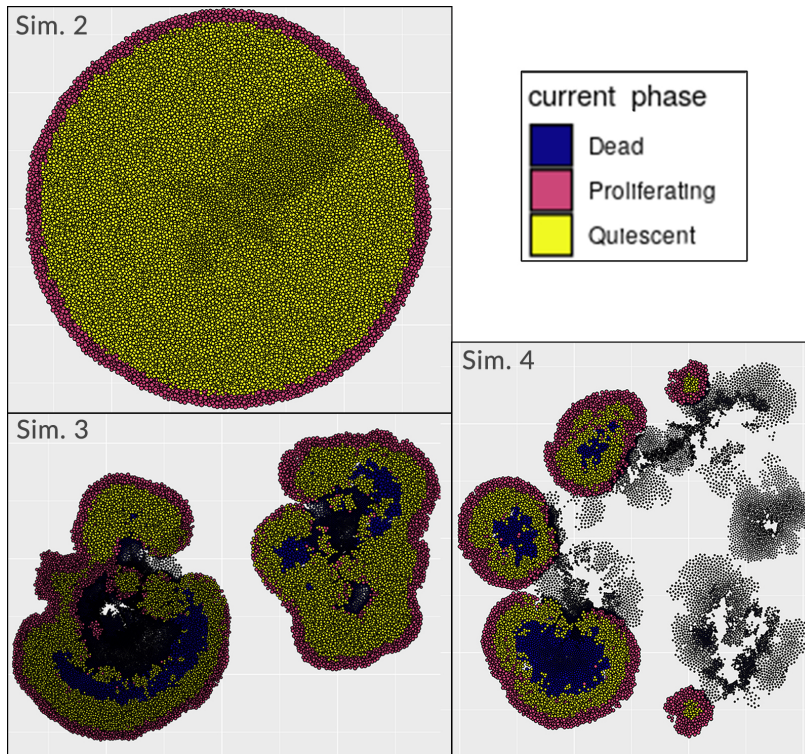


FIGURE 4.28 – Répartition des états cellulaires des sphéroïdes des fins de simulation 2, 3 et 4. En bleu les cellules ont commencé le processus nécrotique, en jaune les cellules sont en état de quiescence (G0) et en rose, en état prolifératif (G1,S,G2,M). En noir les débris cellulaires, sont progressivement supprimés de la simulation.

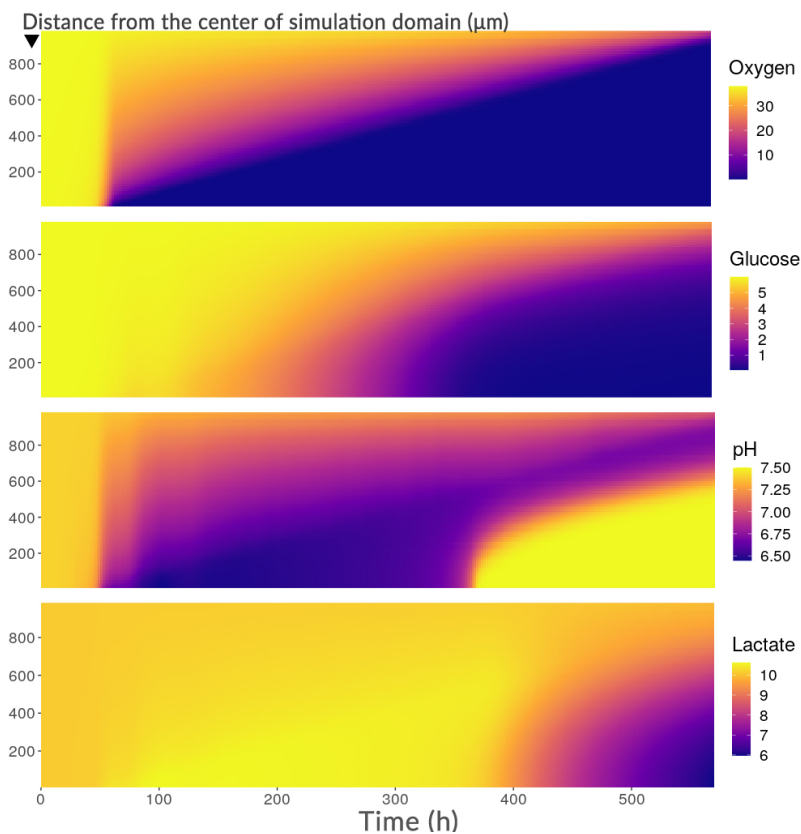


FIGURE 4.29 – Profils radiaux moyens des concentrations en substrat dans l'environnement de la simulation 2 au cours du temps. Les quatre figures présentes vont jusqu'à 570 h de vie du sphéroïde.

Pour la simulation 3, l'oxygène est en concentration faible (16.5 mmHg) et proche des niveaux d'hypoxie. Les conditions aux bords sont un peu particulières car le pH est imposé aux bords alors que la concentration en lactate non. En d'autres termes,

si le lactate s'accumule très rapidement dans la simulation les protons produits eux, ne le peuvent pas autant, les bords de la simulation imposant une valeur de pH. *In vivo* c'est comme si un réseau vasculaire entourant la tumeur évacuait les protons mais pas le lactate. En général ce n'est pas ce qui se produit, puisqu'un réseau vasculaire désordonné/inefficace n'éliminerait pas non plus l'acidité. Cependant en imaginant d'autres mécanismes pouvant influencer sur le pH extracellulaire (hors excrétion d'acide lactique via les MCT), ce scénario demeure pertinent. Ici la question est de savoir comment le tissu peut croître dans un environnement très peu oxygéné dans lequel s'accumule le lactate.

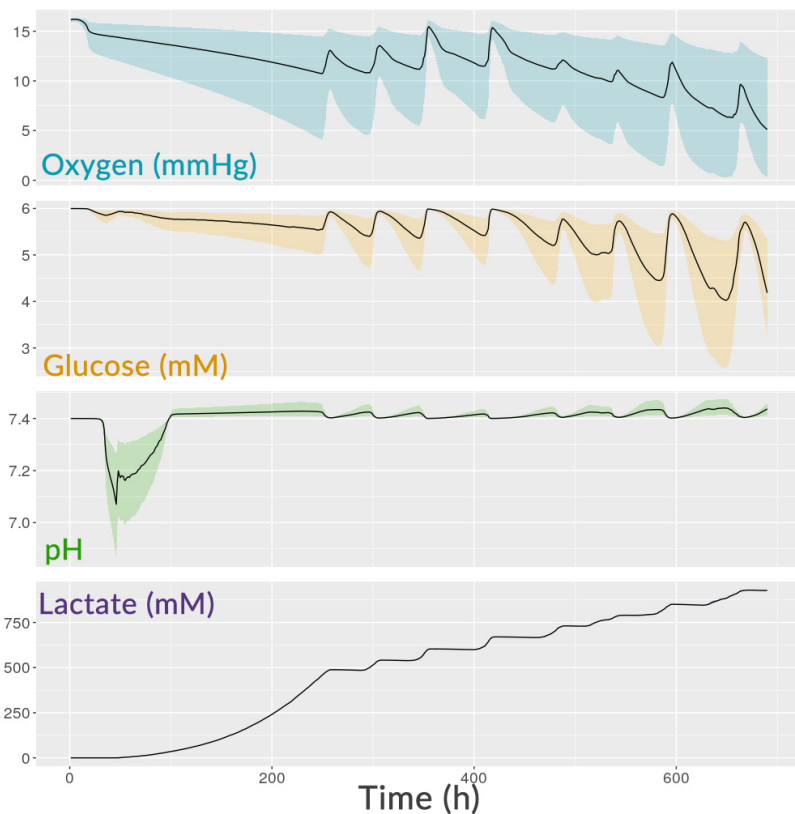


FIGURE 4.30 – Concentrations des substrats et pH médians dans l'environnement de la simulation 3 au cours du temps. Les quatre courbes présentes vont jusqu'à 695 h de vie du sphéroïde. Les rubans de couleurs définissent les écarts interquartiles.

La figure 4.30 montre les conséquences de ces conditions sur l'évolution des concentrations de l'environnement. Ici l'asymétrie radiale qui s'installe dans le tissu (voir figure 4.24) ne permet pas de réaliser les mêmes profils radiaux sans introduire un biais dans la visualisation de l'évolution des concentrations en fonction de la distance au centre. Cette évolution est donc présentée par la médiane de l'ensemble de l'environnement et son écart interquartile pour rendre compte de la distribution. Dans un premier temps comme dans les exemples précédents, la concentration en oxygène diminue, le glucose légèrement et le pH descend. Le lactate s'accumule dans le milieu et dans les cellules. Le pH remonte lorsque des cellules commencent à mourir au centre du sphéroïde, ce qui permet d'alterner entre consommation de glucose par la glycolyse et consommation de lactate présent en forte quantité, sans pour

autant empêcher l'accumulation du lactate dans le milieu. Lorsque l'oxygène se fait trop bas pour maintenir un niveau d'ATP suffisant (peu après 200 h), des cellules finissent par mourir de manière plus régulière (comme le montre la figure 4.24 à plusieurs reprises dans la vie du sphéroïde). Le pH extracellulaire maintenu à niveau physiologique favorise la consommation de glucose tandis que la concentration en lactate extracellulaire atteint un niveau extrêmement élevé, hors de tout cadre physiologique. Bien que le pH extracellulaire n'empêche pas la glycolyse, son activité est diminuée par l'accumulation du pyruvate intracellulaire qui n'est pas consommé dans la mitochondrie (par manque d'oxygène), et peu transformé en lactate déjà présent en forte quantité. La production d'ATP par la glycolyse, ainsi réduite ne compense pas la baisse de la respiration cellulaire ce qui provoque la mort des cellules.

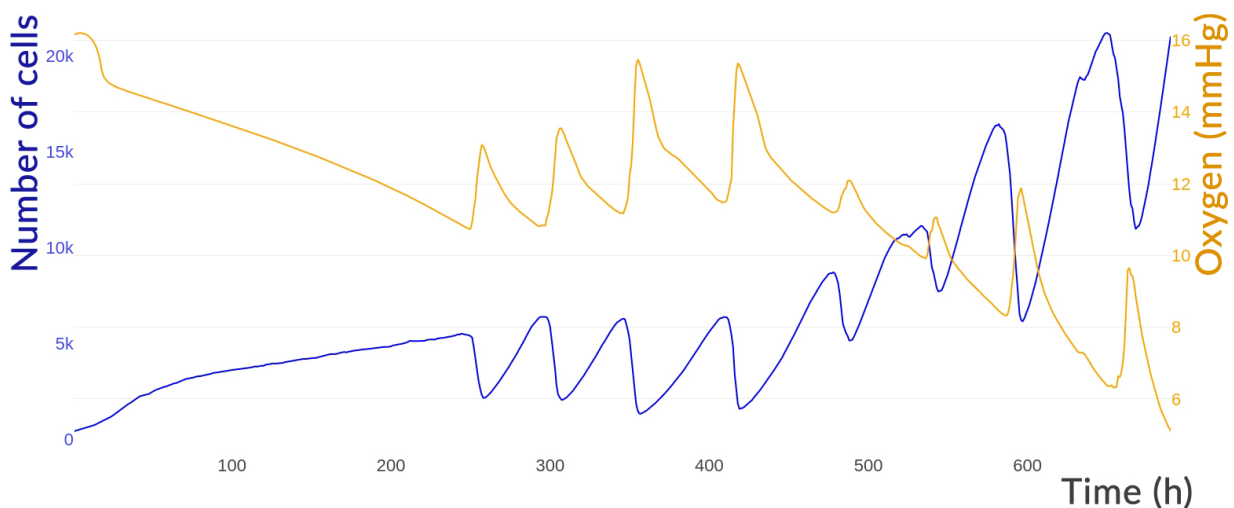


FIGURE 4.31 – Évolution de la valeur médiane de concentration d'oxygène dans l'environnement et du nombre de cellules en vie dans la simulation 3. Le nombre de cellules en vie (prolifératives et quiescentes) est représenté sur l'axe des ordonnées de gauche et la concentration d'oxygène (mmHg) médiane dans l'ensemble de l'environnement à droite.

Lorsque ces cellules meurent (chutes régulières de la population sur la figure 4.31), elles permettent momentanément une reperfusion du tissu en oxygène et glucose (visible par la hausse des concentrations et la réduction de l'écart interquartile sur la figure 4.30) qui devient plus homogène. Certaines cellules peuvent éventuellement réussir à se diviser réaugmentant la population juste au-dessus du seuil critique de consommation des nutriments, réitérant cycliquement le processus décrit précédemment.

Dans ce cas, les conditions environnementales sont à la frontière entre des conditions parfaitement hostiles empêchant les cellules de se développer et des conditions juste assez favorables à ce que certaines cellules parviennent à se maintenir en vie. On a ainsi une forme de survie "étouffée" du tissu qui par des morts successives touchant des zones entières du sphéroïde génèrent les colonies observées dans la figure 4.24. Ces colonies sont la raison pour

laquelle le nombre de cellules en vie continue d'augmenter. En un seul unique tissu, la déplétion locale d'oxygène, de glucose et de lactate serait bien trop importante. La simulation 4 qui possède des conditions d'oxygénation encore plus sévères génère les mêmes profils environnementaux, plus rapidement (figure non montrée).

4.5.3 Complexité des interactions

Comme le montre l'ensemble des simulations précédentes, le tissu tumoral en croissance perpétuelle ne bénéficiant pas d'une vascularisation adéquate dans la simulation (comme cela pourrait être le cas *in vivo*), il finit tôt ou tard par survenir un état de déplétion d'oxygène, de glucose ou des deux en même temps. Dans les expériences *in vitro* faites sur de vrais sphéroïdes ces conditions peuvent être un peu évitées par le renouvellement régulier du milieu, et par le fait que les cellules lorsqu'elles atteignent la confluence réduisent, voir stoppent leur croissance. Cependant, tôt ou tard, ces gradients d'oxygène et/ou de glucose apparaissent aussi, pour peu que le sphéroïde ait eu suffisamment la place de croître.

L'hétérogénéité intrinsèque du métabolisme des cellules rend difficile de tirer une loi générale sur l'évolution du tissu en réponse aux conditions environnementales. Notamment la dynamique tissulaire prend rapidement le pas sur la dynamique métabolique individuelle de chaque cellule. Ainsi sur de nombreuses simulations les comportements qui émergent ne sont pas toujours systématiquement anticipables. Cependant, sur un nombre de simulations important les tendances suivantes se dégagent :

TABLE 4.6 – Tendances générales des simulations en fonction des conditions extérieures. Les concentrations en oxygène, glucose et lactate sont reportées qualitativement et la colonne résultats indique les conséquences de ces conditions sur les cellules exposées.

Oxygène	Glucose	Lactate	Résultats
+	+	++	Importation de lactate
+	+	+	Excrétion de lactate
+	+	-	Excrétion assez faible de lactate
+	-	+	Importation de lactate
+	-	-	Mort
-	+	+	Excrétion de lactate
-	-	+	Mort
-	-	-	Mort

Ainsi, le lactate est généralement excrété de la cellule lorsque l'oxygène est en faible quantité dans l'environnement ou lorsque

du lactate est déjà présent dans l'environnement. En effet, lorsque du lactate est présent, l'expression du gène HIF-1 α est augmentée, ce qui induit (bien qu'il y ait de l'oxygène) une augmentation de la glycolyse. S'il n'y a pas de lactate mais du glucose et oxygène en concentrations suffisantes, alors la production est globalement dirigée vers la respiration, la production de lactate est relativement faible (mais pas inexistante).

En revanche si du lactate est présent en grande quantité dans l'environnement, les cellules auront tendance à l'importer, suivant le gradient de concentration. Cela n'empêche pas pour autant la cellule de continuer à en produire (par fermentation) en l'accumulant à l'intérieur. Le lactate est également importé quelle que soit sa concentration, en présence d'oxygène et combiné à l'absence de glucose, pour régénérer le niveau de pyruvate utilisé par la mitochondrie.

Ce qui rend délicat l'aboutissement à l'identification de ces tendances provient des sources de variabilité dans les conditions extérieures aux cellules. Fixer les niveaux d'oxygène, de glucose, de lactate ou le pH, n'empêche pas des cellules d'une couche du sphéroïde de générer localement, des situations contraires. Par exemple, des cellules en hypoxie produisent du lactate en grande quantité et baissent le pH des cellules à la périphérie qui se retrouvent contraintes d'utiliser du lactate à la place du glucose. Ces interactions entre cellules sont une source importante d'hétérogénéité souvent masquée par les comportements moyennés évalués dans un bon nombre d'expériences [72].

Pour l'illustrer une nouvelle simulation est présentée (dont les paramètres généraux sont listés Table 4.7).

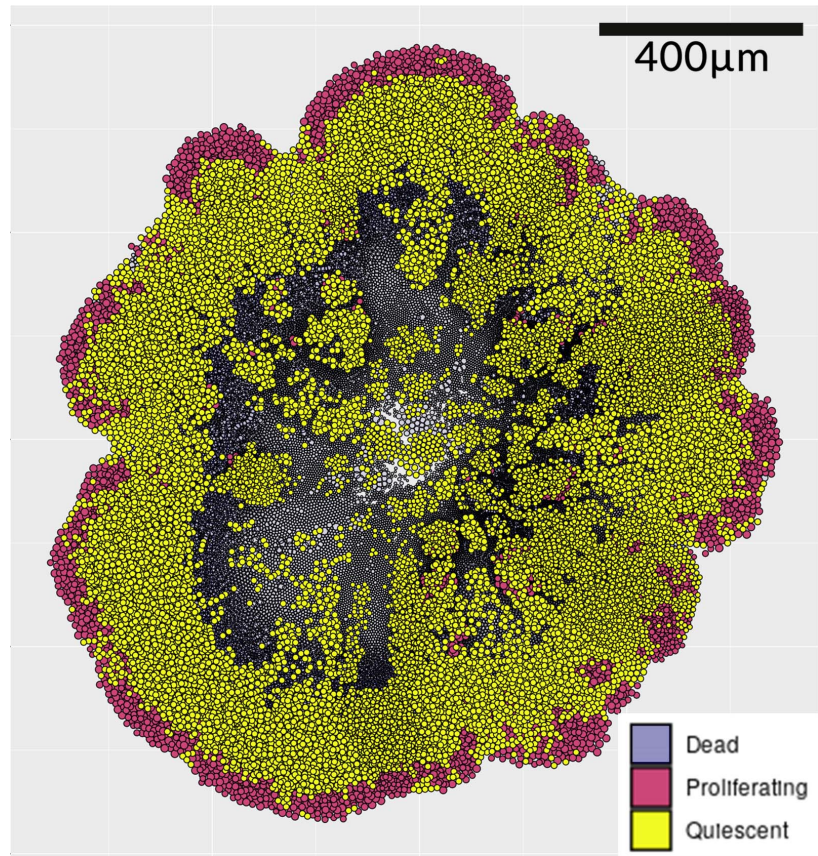
Dans cette simulation, l'oxygène est à pression atmosphérique (donc en très fort excès) alors que le glucose n'est qu'à 1 mM donc en très faible quantité. Le lactate en début de simulation est à 0 mM mais peut s'accumuler sans être éliminé par le milieu. Le pH est acide dès le début et pour les protons, là aussi la concentration aux bords du domaine n'est pas fixée. Les cellules ne peuvent que très peu utiliser le glucose, parce que présent en très faible quantité et le pH au départ acide, ralentit la glycolyse.

L'objectif initial de cette simulation était d'évaluer si, les cellules tumorales demeurent réellement dans un métabolisme glycolytique alors que les conditions pour y rester sont défavorables. En d'autres termes, l'effet Warburg (avec la définition moderne, excrétion de lactate en présence d'oxygène) est-il systématique? Les précédentes simulations ont déjà montré que ce n'était pas le cas, cependant cette simulation est aussi intéressante du point de vue de l'interaction cellulaire.

TABLE 4.7 – Paramètres généraux de la simulation 6. Lorsque la mention "-N" succède aux valeurs, cela indique que les conditions aux bords sont des conditions de Neumann (les valeurs correspondent alors seulement aux concentrations initiales).

N°	6
Type	2D
Nb. initial	440
Nb. final	37 500
Durée (h)	420
O ₂ (mmHg)	160.0
Glucose (mM)	1.0
Lactate (mM)	0.0-N
pH	6.7-N

FIGURE 4.32 – Répartition des états cellulaires du sphéroïde de la simulation 6 à 420 h. En bleu semi-transparent, les cellules ont commencé le processus nécrotique, en jaune les cellules sont en état de quiescence (G0) et en rose, en état prolifératif (G1,S,G2,M).



Le sphéroïde suit lui aussi toujours la même répartition au niveau des couches proliférative, quiescente et nécrotique (figure 4.32). La majorité des cellules sont en quiescence mais un front prolifératif demeure là où l'oxygène est en plus grande concentration.

La figure 4.33, montre assez logiquement, que le tissu utilise le pyruvate au travers de la respiration (cellules violet foncé). Là où l'oxygène se fait plus rare au centre, quelques îlots cellulaires n'ont pas d'autre choix que d'utiliser le peu de glucose à disposition. Les cellules sont indiquées pour une bonne partie d'entre-elles comme ayant un phénotype type Warburg inverse, tandis qu'un faisceau vertical et centré de cellules, produit l'effet Warburg. Là encore des zones assez grandes excrètent du lactate tout en ayant un phénotype majoritairement oxydatif. Le glucose bien qu'en très faible quantité est disponible en continu à partir des bords et le lactate peut s'accumuler (figure 4.34).

Au bout d'un certain temps les cellules qui meurent (proches de la zone 3 sur la figure 4.33), relâchent le lactate, le glucose et les protons qui sont rapidement importés par les cellules alentours. De manière émergente les morts cellulaires ont engendré une asymétrie interne dans le tissu ainsi qu'au niveau de la diffusion des substrats. Le peu de glucose consommé par les cellules en hypoxie (notamment au niveau de la zone 1) sert à produire du

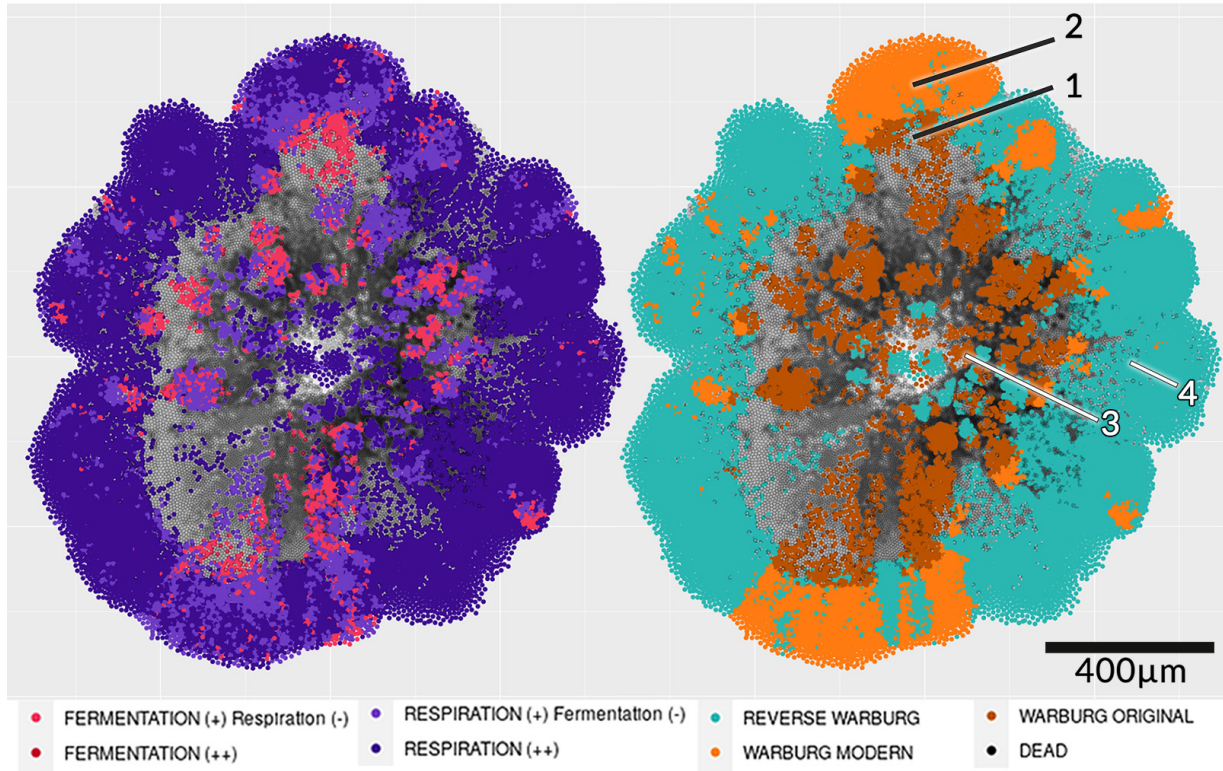


FIGURE 4.33 – Phénotypes cellulaires du sphéroïde de la simulation 6 à 420h. À gauche la coloration correspond aux phénotypes cellulaires de fermentation et/ou respiration. À droite les cellules sont colorées par rapport à leur phénotype correspondant aux définitions associées à l'effet Warburg. Lorsqu'un processus est décrit avec un (-) cela signifie qu'il est présent mais en proportion plus faible que celui marqué par un (+). Les cellules noires sont en nécrose.

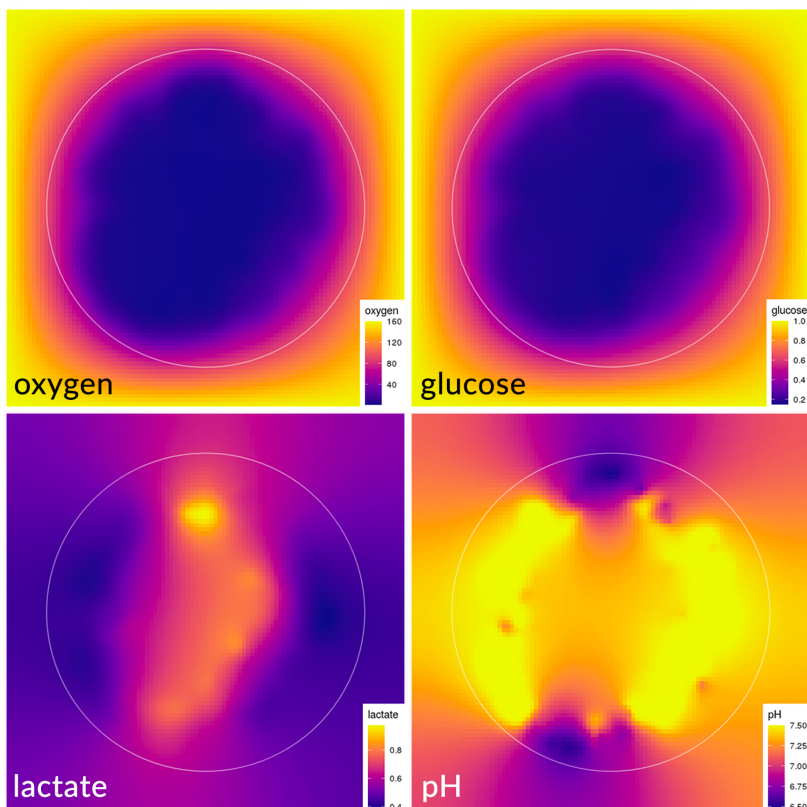


FIGURE 4.34 – Concentrations extracellulaires dans la simulation 6 à 420h. Les concentrations en oxygène (haut gauche) s'échelonnent de 0 à 160 mmHg, en glucose (haut droit) de 0.2 à 1.0 mM, en lactate (bas gauche) de 0.4 à 0.97 mM et le pH (bas droit) de 6.49 à 7.49.

lactate et de l'acidité qui s'accumulent dans ces cellules (zone 1 et 2) et dans le milieu (à l'équilibre entre les deux).

Ce faisant elles augmentent leur niveau de pyruvate et maintiennent plus facilement leur niveau d'ATP. Entourées d'acide lactique les cellules de la zone 2 réduisent leur consommation de glucose et émettent le lactate qu'elles ont en trop dans leur cytoplasme et provenant de la zone 1. Ainsi le lactate se retrouve en dehors du sphéroïde et diffuse dans le reste de l'environnement. Ce lactate est récupéré par les cellules sur les côtés du sphéroïde (comme au niveau de la zone 4) qui en le transportant à l'intérieur de leur cytoplasme réduisent le pH aux alentours. La plupart des cellules de la périphérie du sphéroïde ont donc bien un métabolisme majoritairement oxydatif mais face à la déplétion de glucose et aux conditions d'acidité localisée, c'est l'avidité pour le lactate, source d'énergie potentielle qui crée la dynamique tissulaire.

La figure 4.35 confirme ce mécanisme. Les cellules en hypoxie (zone 1) apparaissent clairement en bleu sur le sphéroïde avec la coloration des flux de LDH. Le pyruvate est dirigé vers la production de lactate alors que pour les autres en rouge c'est le lactate qui est transformé en pyruvate. Pour les flux de lactate et protons (MCT), à ce stade de la simulation, il s'agit essentiellement d'import de lactate par les cellules sur les côtés du sphéroïde.

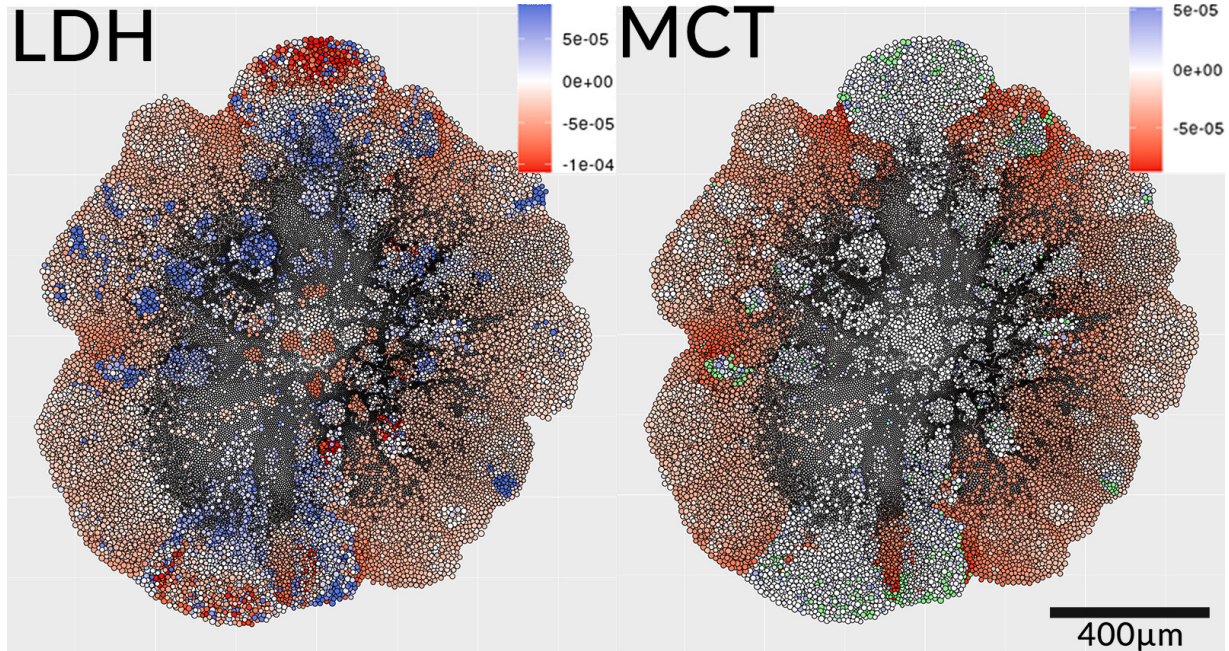


FIGURE 4.35 – Flux de la réaction catalysée par LDH (r12) et de transport du lactate via les canaux MCT (r21) dans le sphéroïde de la simulation 6 à 420h. Les flux sont exprimés en mM/min. Une valeur négative indique que la réaction ou le transport est en sens inverse (lactate vers pyruvate et lactate extracellulaire vers lactate intracellulaire). Les quelques cellules en vert sur le sphéroïde de droite représentent celles qui produisent beaucoup plus de lactate que les autres (environ 20x plus). Elles apparaissent en vert pour ne pas gêner la coloration des autres cellules.

Les cellules apparaissent majoritairement en blanc au niveau de la zone 2 et excrètent peu de lactate (relativement à celles qui l'importent). De rares cellules (en vert) ayant beaucoup accumulé de pyruvate excrètent beaucoup de lactate (de l'ordre de 20x plus que les autres à environ 10^{-3} mM/min).

Ces simulations montrent qu'il est incertain de parler d'effet Warburg en pensant cibler de manière particulière un unique type de métabolisme. Si l'effet Warburg apparaît à l'échelle macroscopique (au niveau du tissu) ce n'est pas particulièrement le cas au niveau des cellules individuelles. Comme cela a été exploré dans le chapitre 2, les définitions qui s'y rattachent ne permettent ni de préciser les contours d'un comportement métabolique précis au niveau cellulaire et encore moins des valeurs seuils (par exemple "est l'effet Warburg la production de X quantité de lactate en présence de X quantité d'oxygène"). Même sans définir ces seuils, en prenant le tissu dans son ensemble et en considérant simplement la production de lactate (observation originale d'Otto Warburg) l'effet Warburg n'est pas ubiquitaire.

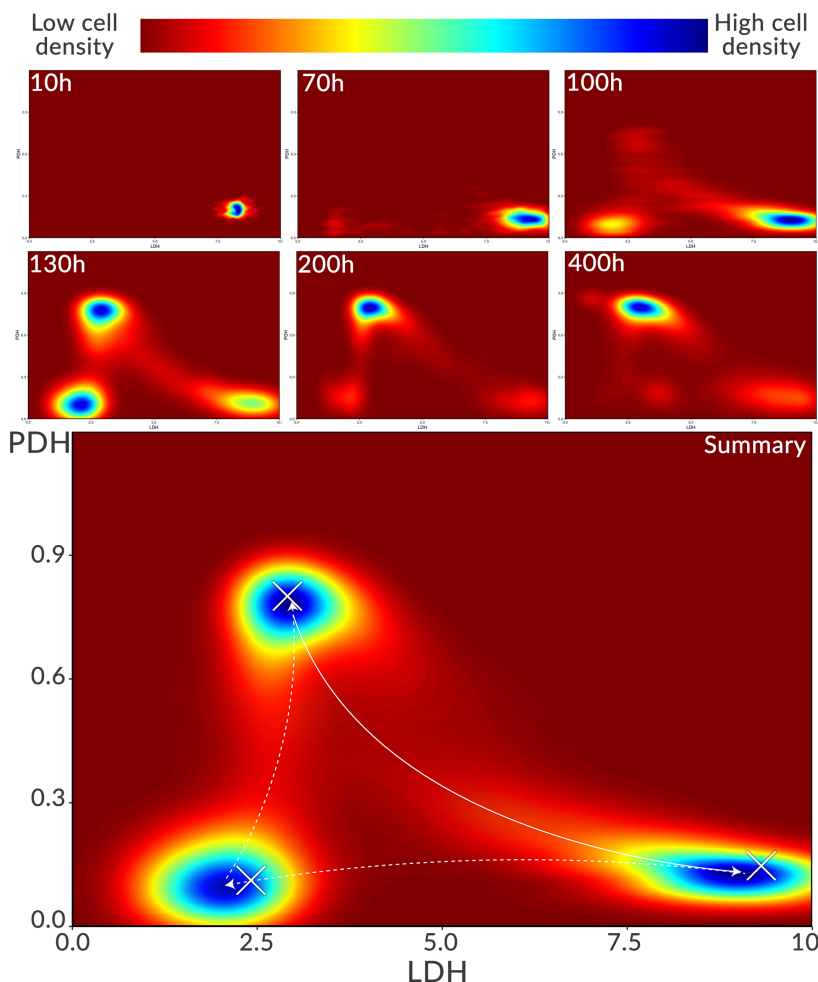


FIGURE 4.36 – Évolution du paysage métabolique du tissu de la simulation 6 et 6 bis au cours du temps. Les cartes présentent les zones de densités métaboliques (nombre de cellules), au niveau de l'expression des gènes LDH et PDH. Les zones rouges sont des zones où très peu de cellules se trouvent à l'inverse des zones bleues qui en regroupent une importante quantité. La carte présentée en bas est l'agrégation du paysage métabolique dans le temps, accumulant les zones de fortes densités. Les croix indiquent le point de regroupement des cellules de la simulation 6 bis, quasi identique à la simulation 6 mais pour laquelle les forces de régulation génétiques cellulaires n'évoluent pas avec le temps.

Au niveau du paysage métabolique, trois zones sur les quatre sont identifiées (figure 4.36). Dans un premier temps (~ 10 h), les cellules

peu nombreuses, bénéficient du peu de glucose présent en axant leur métabolisme vers la zone glycolytique (c'est-à-dire en bas à droite, PDH peu exprimé et LDH fortement exprimé). Rapidement (~ 70 h), une partie des cellules sont poussées à adopter un mode métabolique moins glycolytique (retour dans la zone qualifiée de "neutre" en bas à gauche) principalement à cause de l'acidité que ce mode a engendré. Ces cellules se déplacent le long de l'axe LDH sans réellement varier dans l'expression de PDH. À 100 h, le manque de glucose s'installant durablement dans certaines zones du sphéroïde, pousse les cellules au mode glycolytique et normal à converger vers le mode oxydatif (en haut à gauche). Des cellules de la zone glycolytique subissent la déprivation en glucose et l'augmentation de l'acidité. Au lieu de passer d'abord par la zone neutre, elles sont poussées directement dans la zone oxydative. Ce phénomène est visible notamment à partir de 130 h (figure 4.37) et jusqu'à la fin de la simulation.

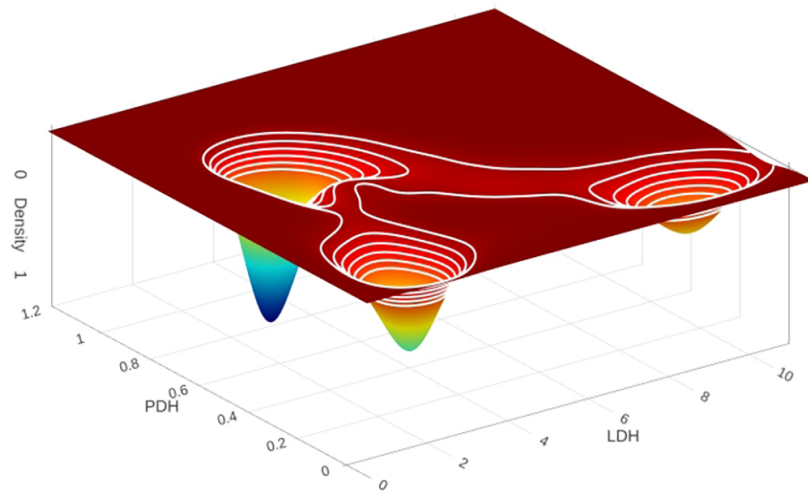


FIGURE 4.37 – Densité cellulaire dans la bifurcation LDH/PDH de la simulation 6 à 130h.

À 400 h, la population cellulaire est majoritairement répartie entre un mode oxydatif et un mode glycolytique, mais il s'agit d'une vision d'ensemble et bien que la majorité des cellules soit regroupée en clusters dans ces attracteurs, des transitions entre les trois modes continuent de survenir (visible par les traces entre clusters). La dernière image de la figure 4.36 représente l'agrégation de ces trois attracteurs au cours de la simulation et les trajectoires décrites.

4.5.4 Influence du réseau de régulation génétique

Pour identifier le rôle du réseau de régulation génétique, la même simulation a été répétée (simulation 6 bis) mais en enlevant la modification des paramètres γ au cours du temps et lors des divisions. Ce faisant, seule l'évolution de l'environnement autour des cellules influence leurs parcours dans le paysage métabolique. Les cellules se sont alors focalisées précisément au niveau des

croix blanches indiquées sur la dernière image de la figure 4.36. Globalement, elles se sont rendues dans les mêmes zones que les cellules de la simulation 6 un peu moins rapidement. L'absence de variation dans l'expression des gènes de la simulation 6 bis, empêche de créer une carte de densité en raison du rapprochement des cellules au niveau des croix. Ce que montre cette différence entre les deux simulations, c'est que les conditions extérieures dictent la trajectoire des cellules au sein de zones bien localisées ainsi que la macro-temporalité.

Ici la force de régulation des gènes permet de fluctuer autour des points d'attractions en modifiant localement la topologie (ceci est détaillé plus en détail dans la publication du modèle original [84]) et d'influer la micro-temporalité. Des cellules avec un épigénome différent pourront explorer de manière anticipée d'autres modes métaboliques ou au contraire rester plus longtemps dans un certain mode.

In vivo, la pression de l'environnement, le stress auquel les cellules tumorales sont soumises, sélectionnent finement ces modifications. Dans le modèle, la seule sélection faite, a lieu par l'éventuelle mort des cellules si les modifications apportées au réseau de régulation les forcent à rester dans un mode qui n'est pas viable pour elles. Au-delà de la survie même des cellules, de nombreux autres facteurs peuvent pousser les cellules à réguler différemment leur métabolisme, ici ce processus est parfaitement aléatoire.

Ceci étant dit, il n'y a pas non plus de différence dans le nombre de morts de cellules entre la simulation 6 et la 6 bis. Cela peut s'expliquer par plusieurs facteurs : les paramètres initiaux étant calibrés sur des données expérimentales, les forces de régulation γ sont proches des conditions permettant de rester dans des attracteurs viables pour la cellule. Également, la variation de ces paramètres dans la simulation 6 n'est peut-être pas suffisante pour sortir de manière pérenne de ces attracteurs et entraîner la cellule dans un mode de fonctionnement délétère et irréversible. Enfin, au regard des conditions environnementales, les morts dues à la variation ou l'absence de variation dans le réseau de régulation sont peut-être négligeables.

4.6 Bilan des résultats

Les différentes simulations réalisées ont permis d'identifier de manière émergente, des comportements métaboliques divers et spatio-temporellement définis. La simulation 1 a montré la répartition radiale standard des états cellulaires (prolifératif, quiescent et nécrotique) au sein d'un sphéroïde. Elle a montré l'impact du métabolisme sous-jacent sur l'environnement avec principalement une déplétion d'oxygène forte dans les couches internes du sphéroïde et une hausse de l'acidose lactique. Ces profils correspondent aux observations classiques de sphéroïdes *in vitro* [197, 198]. Elle a également mis en évidence un découplage partiel entre l'effet Warburg et le type de phénotype métabolique. Des cellules essentiellement respiratoires peuvent exprimer l'effet Warburg en sécrétant du lactate. Ceci se traduit par une hétérogénéité marquée de la répartition des cellules du sphéroïde au sein du paysage métabolique défini par l'expression des gènes LDH et PDH. À terme, c'est cependant un état métabolique intermédiaire qui prédomine dans le tissu.

[197]: WALENTA et al. (2000), « Metabolic Imaging in Multicellular Spheroids of Oncogene-transfected Fibroblasts »

[198]: NUNES et al. (2018), « 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs »

Les simulations d'oscillations de la concentration d'oxygène ont montré la stabilité à court terme, du métabolisme à ces variations ainsi que la résurgence de l'effet Warburg inverse sur les phases de réoxygénation du tissu. Les simulations de chocs acides ont également montré la stabilité du métabolisme face aux variations brutales du pH. Les pH plus acides permettent à l'effet Warburg inverse d'être plus fortement exprimé (phénomène expérimentalement observé [54]) ce qui se traduit également dans le paysage métabolique par une augmentation de l'expression de PDH. La déplétion du glucose extracellulaire a un effet plus lent, dépendant des réserves intracellulaires. Les répercussions sur le métabolisme sont limitées tant que le lactate (et par extension les autres sources permettant de continuer à alimenter la respiration) est disponible. Une fois ces sources épuisées, cette condition est la plus critique pour la survie des cellules qui meurent rapidement.

Les simulations suivantes mettent en évidence la complexité des multiples comportements pouvant avoir lieu au sein d'un même tissu, avec des phénomènes d'étouffement cyclique lorsque les conditions extérieures sont à la limite à peine suffisantes pour permettre à quelques cellules de proliférer. Il peut aussi y avoir des phénomènes de collaborations cellulaires indirectes, de "symbiose métabolique" [199], les produits métaboliques d'une cellule exposée localement à certaines conditions environnementales bénéficiant à une autre cellule exposée à des conditions différentes.

[199]: CRUZ-LÓPEZ KG et al. (2019), « Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches »

À l'issue de ces expériences, il est possible de conclure que le métabolisme est relativement robuste face aux perturbations envi-

ronnementales au moins sur des temps courts (< 1 mois). En réalité, ce qui introduit une instabilité dans l'organisation métabolique d'un tissu ne provient pas intrinsèquement du métabolisme, mais de l'existence de conditions anormales dans lesquelles sont poussées les cellules (la déplétion du glucose dans l'environnement entraînant à terme la mort est un exemple). Un sphéroïde, également, est une configuration tissulaire anormale de par sa densité élevée ou encore l'absence de vascularisation. Le métabolisme en lui-même a toutes les propriétés biochimiques et thermodynamiques [14] pour continuer à être opérationnel du point de vue du maintien de la viabilité cellulaire.

Conclusions et perspectives

Cette thèse a permis de s'intéresser à l'adaptabilité du métabolisme face aux perturbations de l'environnement auxquelles une tumeur peut-être exposée. Une des manifestations du métabolisme tumoral, l'effet Warburg, décrit depuis bientôt un siècle, est souvent présentée dans la littérature moderne comme une caractéristique universelle du métabolisme tumoral. Or de plus en plus d'expériences montrent que ce n'est pas systématiquement le cas à l'échelle cellulaire. Le travail effectué a permis de mettre en avant la déviation sémantique associée à l'effet Warburg, ainsi que des notions qui y sont souvent rattachées comme "switch" ou "reprogrammation" métabolique [200]. Loin de négliger la part importante des mutations dans l'émergence de tumeurs, elles ne peuvent cependant pas expliquer toutes les observations propres au métabolisme et à ses propriétés intrinsèques et ne sont pas forcément nécessaires pour expliquer la plupart des comportements métaboliques.

Ce qui ressort, de cette étude de la littérature révèle la nécessité d'intégrer toutes les échelles biologiques pour étudier la complexité des comportements tumoraux. Ces approches sont de plus en plus mises en avant à mesure que l'instrumentation évolue (notamment par les approches multiomiques) et que la puissance de calcul augmente. Il reste aussi important de coupler mesures tissulaires et cellulaires pour rendre compte des différences de dynamiques [73]. S'il est ainsi possible de prétendre que le métabolisme des tumeurs soit l'un des états définis d'un réseau métabolique unifié, il devrait donc être possible de produire un modèle capable de générer ces différents états.

La thèse a permis de développer un modèle du métabolisme tumoral mettant en lumière son hétérogénéité spatiotemporelle. Ce modèle permet de tester différents scénarios de stress environnemental et d'en évaluer les conséquences sur la trajectoire métabolique des cellules individuellement ainsi que du tissu dans son ensemble. De plus en combinant des approches continues et discrètes au sein de ce nouveau modèle hybride, le métabolisme des cellules est contextualisé spatialement et des comportements complexes émergent.

Dans ce nouveau modèle, l'environnement est un maillage dans lequel quatre espèces (l'oxygène, le glucose, le lactate et les protons) diffusent. Le tissu prend place par-dessus ce maillage et est défini par l'ensemble des cellules qui le compose chacune pouvant se

[200]: [WARD et al. \(2012\)](#), « Metabolic Reprogramming : A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate »

positionner en n'importe quel point du domaine de simulation. Une cellule possède ses propres concentrations en métabolites, niveaux d'expression génique, cycle cellulaire, volume. Elles ont ainsi toutes un système d'équation différentiel commun mais avec des variables et paramètres d'entrées de valeurs différentes. Les cellules interagissent avec l'environnement via des flux entrant et sortant des quatre espèces qui s'y trouvent.

Il étend le modèle mathématique existant sur lequel il est basé et qui est calibré sur des données expérimentales [84], en y intégrant le rôle du lactate et de l'acidité. Cela inclut la réversibilité des flux de lactate entre la cellule et l'environnement (flux entrants), le rôle de l'acidité sur la direction de ces flux ainsi que l'impact de cette acidité sur l'activité glycolytique. Ces ajouts sont basés sur les récentes observations tirées de la littérature [165]. Sans ces points, l'effet Warburg inverse ne peut pas émerger dans une simulation et de fait une cellule ne peut mécaniquement qu'excréter du lactate. S'il est difficile de faire consensus sur la définition précise de l'effet Warburg, il l'est encore plus pour en caractériser les seuils d'oxygène ou de lactate. À défaut, deux définitions sont utilisées, la définition originale se conformant aux observations d'Otto Warburg "excrétion de lactate dans les tissus tumoraux" et la moderne "excrétion de lactate en présence d'oxygène dans les tissus tumoraux". Malgré ces deux définitions, il apparaît dans les résultats des différentes simulations présentées dans le chapitre 4, que l'effet Warburg, quelle que soit la définition donnée, n'est pas ubiquitaire. De plus la temporalité jouant un rôle important, l'expression de l'effet Warburg n'est pas toujours directement corrélée avec l'activité fermentatoire de la cellule. Au contraire, l'état métabolique de la cellule tumorale est défini par l'équilibre subtil entre les conditions environnementales et les conditions internes de la cellule définies par son historique. Cet état n'est pas binaire et est ajusté en continu en utilisant les moyens à disposition de la cellule lui permettant de ne pas trop s'éloigner de son homéostasie. Il ressort (dans ce modèle) que ces moyens sont essentiellement de nature thermodynamique (via l'activité enzymatique). Ici la régulation de l'expression génique, permet de remodeler localement le paysage métabolique dans lequel la cellule évolue et d'ajuster la vitesse de transition entre états.

Il y a néanmoins plusieurs limitations. Une d'entre elles concerne le cycle cellulaire. De nombreux éléments de régulations interviennent dans le cycle des cellules (les cyclines notamment ou HIF1- α présent dans le modèle) [201, 202]. Ils peuvent avoir un rôle important dans le nombre de divisions, l'arrêt dans certaines phases (G0 notamment) et donc à terme sur la croissance et la morphologie du tissu. Le métabolisme pourrait être plus directement lié au cycle, avec la variation de la consommation de certains

[201]: ORTMANN et al. (2014), « Cell cycle progression in response to oxygen levels »

[202]: KOSHIIJI et al. (2004), « HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc »

métabolites (ATP par exemple) en fonction des phases. Dans les simulations d'oscillations d'oxygène en particulier, ce pourrait être une source de perturbations qui forcerait le métabolisme à dévier progressivement. Dans cette thèse le cycle cellulaire permet simplement de définir la fréquence de division en la rendant légèrement plus ou moins rapide en fonction de l'oxygène ou en bloquant les cellules si le niveau d'ATP est trop bas ou la densité locale trop haute. En dehors de ces aspects élémentaires, le cycle cellulaire n'est pas impacté.

De la même manière certains des gènes présents dans le modèle n'ont pas d'autre rôle que d'intervenir dans le réseau de régulation. Le VEGF en particulier, n'initie pas ici la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ainsi là où *in vivo* l'hypoxie via le VEGF suscite des réoxygénations localisées [203], dans les simulations les cellules subissent l'hypoxie sans rétroaction, ce qui se rapproche d'une situation *in vitro* mais ne correspond pas nécessairement aux réponses à long terme d'une tumeur. Les autres sources possibles de nutriments pour la cellule ne sont pas non plus prises en compte (glycogène, glutamine, acides gras...) pour se focaliser sur les substrats principaux mis en jeu dans le cancer (bien que la glutamine notamment soit de plus en plus mise en avant [204]). Le modèle et plus généralement, l'ensemble du programme permettant de le simuler est extensible et pourrait donner lieu à de nombreux ajouts si la complexité qui en découle ne devient pas nuisible à la compréhension des phénomènes. Ces aspects pourraient donc être adressés à l'avenir.

Un dernier point concerne la 3D. Pensé à la base pour être intégralement simulé en 3D, le modèle s'est avéré bien plus coûteux en temps de calcul que prévu, essentiellement provoqué par le choix d'adopter une diffusion anisotrope. Ce problème pourrait être contourné en travaillant sur une implémentation plus performante de la diffusion qui permettrait de contourner les contraintes de stabilité du système.

Le travail réalisé a permis d'aborder divers questionnements sous l'angle théorique mais il est envisageable de cibler l'application du modèle dans un cadre thérapeutique précis en testant l'effet de médicaments existants sur le développement de la tumeur de la même manière que cela a été fait par les perturbations de l'environnement. Il y a en effet un engouement pour le repositionnement thérapeutique de molécules [205] qui ciblent le métabolisme, avec par exemple la metformine [206], un médicament prescrit dans le traitement du diabète de type 2 et qui semble posséder plusieurs propriétés anti-tumorales [207] en entraînant notamment une diminution significative des niveaux d'ATP dans la cellule. Cette molécule a déjà été testée et, bien qu'elle ait donné seule des résultats mitigés (réduisant parfois l'efficacité de certaines

[203]: LESART et al. (2012), « On the importance of the submicrovascular network in a computational model of tumour growth »

[204]: CLUNTUN et al. (2017), « Glutamine Metabolism in Cancer : Understanding the Heterogeneity »

[205]: JARADA et al. (2020), « A review of computational drug repositioning : strategies, approaches, opportunities, challenges, and directions »

[206]: BUCZYŃSKA et al. (2022), « Metformin Intervention—A Panacea for Cancer Treatment? »

[207]: BOST et al. (2021), « Metformine et cancer : repositionnement ou non? ... La question se pose »

[208]: SINGH et al. (2021), « Metformin induced lactic acidosis impaired response of cancer cells towards paclitaxel and doxorubicin : Role of monocarboxylate transporter »

[209]: DENG et al. (2018), « Novel application of metformin combined with targeted drugs on anticancer treatment »

[210]: GILLIES et al. (2019), « Targeting acidity in cancer and diabetes »

[211]: COLLIN et al. (2022), « Computational Models for Clinical Applications in Personalized Medicine—Guidelines and Recommendations for Data Integration and Model Validation »

[212]: MOTTINI et al. (2021), « Computer-aided drug repurposing for cancer therapy : Approaches and opportunities to challenge anticancer targets »

chimiothérapies [208]) et variables selon les cancers [207], demeure une piste encourageante pour des couplages avec d'autres molécules [209] ou le ciblage de l'acidité [210]. Le modèle que j'ai développé a le potentiel d'explorer ces couplages et pourrait après certaines améliorations en partie évoquées précédemment, constituer un outil d'aide au pilotage thérapeutique qui prend en considération les caractéristiques propres à chaque patient dans le cadre d'une médecine personnalisée. De nombreux outils de ce type sont actuellement en développement pour des applications cliniques [211, 212] de plus en plus intégratives (multiéchelles).

Annexes

A.1 Articles acceptés

- *"Metabolic Reprogramming, Questioning, and Implications for Cancer"* publié dans "Biology" (MDPI) [213]
- *"Modelling the role of HIF in the regulation of metabolic key genes LDH and PDH : Emergence of Warburg Phenotype"* accepté (sous presse) dans "Computational and Systems Oncology" (Wiley).

Communication

Metabolic Reprogramming, Questioning, and Implications for Cancer

Pierre Jacquet [†]  and Angélique Stéphanou ^{*,†} 

Université Grenoble Alpes, CNRS, TIMC / BCM, 38000 Grenoble, France; pierre.jacquet1@univ-grenoble-alpes.fr

* Correspondence: angelique.stephanou@univ-grenoble-alpes.fr

† Current address: Pavillon Taillefer, Faculté de Médecine, 38700 La Tronche, France.

Simple Summary: The right terminology to describe biological phenomena is important. An inappropriate use can create some bias in the understanding that are not without consequences. In this communication we focus on the use of the term “reprogramming” associated to cancer cell metabolism.

Abstract: The expression “metabolic reprogramming” has been encountered more and more in the literature since the mid-1990s. It seems to encompass several notions depending on the author, but the lack of a clear definition allows it to be used as a “catch-all” expression. Our first intention is to point out the inconsistencies in the use of the reprogramming terminology for cancer metabolism. The second is to address the over-focus of the role of mutations in metabolic adaptation. With the increased interest in metabolism and, more specifically, in the Warburg effect in cancer research, it seems appropriate to discuss this terminology and related concepts in detail.

Keywords: metabolic reprogramming; Warburg effect; cancer metabolism



Citation: Jacquet, P.; Stéphanou, A. Metabolic Reprogramming, Questioning, and Implications for Cancer. *Biology* **2021**, *10*, 129. <https://doi.org/10.3390/biology10020129>

Academic Editor: Pierre Magal
Received: 13 January 2021
Accepted: 3 February 2021
Published: 7 February 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 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

In recent publications, some authors have defined metabolic reprogramming as the “changes of tumor cellular bioenergetics” [1]; “phenomenon that cancer cells reprogram some of their metabolisms” [2]; “the ability of cancer cells to alter their metabolism in order to support the increased energy request[...]” [3] or “mechanism by which cells rewire their metabolism to promote proliferation and cell growth” [4]. These definitions are based, in particular, on the observation that significant areas in tumors exhibit lactic acidosis as well as increased glucose consumption (commonly called the Warburg effect). These changes mainly affect the production of cell energy (in the form of ATP), the synthesis of amino acids, and the surrounding microenvironment.

These definitions also suggest that cancer cells drive their metabolism into a “non-physiological” state in order to fulfill their needs, but the underlying mechanism is not very clear. This anthropomorphism applied to the cell is frequently encountered in such definitions. This makes the theoretical concepts applied to the cell drift towards deterministic mechanisms, which is not necessarily true. Twenty-five years ago, “metabolic reprogramming” used to be related to a genetic/epigenetic origin. It can be tempting to associate genetic modifications and “reprogramming” because of the computational culture in science and, more recently, in biology. However, if there is “reprogramming”, the cell should contain a modified program, implying both the existence of a program and an alternative version of this program. The concept of “program” in biology is often debated and does not reach consensus. The problem is linked to the long-discussed “cell-machine” metaphor [5,6]. A good review on this subject and on the risk of using metaphors in biological sciences was made by Boudry and Pigliucci [7]. The issue that we are addressing here is not only the formulation of a “semantic” problem, but a larger reflection on the perception of cancer metabolism in the literature. The idea of “reprogramming”, beyond its semantic problematic, is linked to the concept of change in gene expression and metabolic routing.

It is therefore interesting to see whether cancer cells must necessarily exhibit a radically different gene expression profile or particular structural modifications to adopt a different metabolism. In this paper, we address one consequence of this semantic drift, which is that cancer cell metabolism is almost systematically described as different from that of a normal cell, and this might not necessarily always be the case.

The two questions that underline our reasoning are: Is it possible to identify one unique universal metabolic feature of cancer cells despite tumor heterogeneity? Can we consider the adaptability of the cell as the main factor in metabolic transitions beyond pathological processes?

2. Is There One Metabolic Signature That Distinguishes a Normal and Tumor Phenotype?

The question that arises is whether metabolic features of cancers are sufficient to portray two different metabolisms (i.e., one healthy and one pathological). For years, many articles [8–10] have emphasized the dual nature of cancer cells: the metabolic switch, for example, is often used to designate the transition from a metabolism based on oxidative phosphorylation to glycolysis, and it often refers to the Warburg effect. The Warburg effect is the observation made by Otto Warburg and published in 1956, stating that cancer cells produce a lot of lactate and consume an elevated amount of glucose. It is the fermentation where the glucose transformed into pyruvate is directed to lactate production. What makes this process peculiar is when it occurs in the presence of oxygen (aerobic glycolysis). Fermentation occurs generally in hypoxia, while cells use respiration in the presence of oxygen. Some authors have pointed out that the use of the term “metabolic switch” might be inappropriate and confusing, and question its nature [11,12]. Indeed, it is now established that cancer cells use both modes of energy production (fermentation and respiration) simultaneously, but in different proportions [13]. The observation that cells can use fermentation with oxygen does not necessarily imply that oxygen is always available or that glucose is their only substrate. The main idea expressed by Warburg in his article “On the origin of cancer cells” [14] was that of the over-expression of fermentation before considering the presence of oxygen or lack thereof. Consequently, this includes both aerobic and anaerobic glycolysis. However, the Warburg effect is today viewed as aerobic glycolysis only; anaerobic glycolysis, which refers to the well-known Pasteur effect, is not cancer specific. Progressively, Warburg’s observation was reduced to aerobic glycolysis, and more and more in the post-1990s literature. Furthermore, some cells lines show strong differences between glucose uptake and lactate secretion, strongly suggesting a non-Warburgian phenotype [11]. In fact, labeling cancer metabolism as “aerobic glycolytic” or described by a “metabolic switch” [13] hides many different metabolic states and the possibility of transient states, and creates a dichotomy in which there are only two exclusive modes of operation for the cell. The prevalence of certain conditions does not exclude the existence of others, which, if they do exist, cannot simply be considered as artifacts.

A recent study [8] showed that under lactic acidosis (a condition encountered in most solid tumors), cells gradually abandon the Warburg phenotype to revert to a non-glycolytic phenotype (high ratio of oxygen consumption). In lactic acidosis, the intracellular pH is lower, which tends to inhibit the activity of most glycolytic enzymes. Protons and lactate, both products of fermentation, are themselves responsible for its alteration. It is a form of feedback inhibition of the glycolysis. The authors of [8] proposed that the Warburg effect confers growth advantage until there is not enough glucose or lactic acid; then, cells need to adapt to the microenvironment and use other substrates. Moreover, extracellular lactate is a substrate that can be reused by the cell, converted back to pyruvate, and used in the tricarboxylic acid (TCA) cycle, a fact that is often overlooked. Thus, the Warburg effect is not always seen in each cancer cell of a given tumor. In these conditions, the Warburg effect cannot be seen as a universal/ubiquitous metabolic marker of cancer cells. It may, however, represent a good marker at the tissue scale. Multiple techniques use the metabolism to target cancer cells and tissues. In particular, FDG-PET (Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography) scanning is used for cancer diagnosis through the detection of

high-glucose-uptake areas. However, this identification by the use of radiopharmaceutical analogues of glucose alone does not ensure the perfect detection of all cancer cells in all cancer types [1,15].

In addition, the metabolic orientation of cells towards the use of aerobic glycolysis is not specific to cancer. Aerobic glycolysis can be frequently encountered during brain activation [16], vessel sprouting, or the development of trained immunity [17], since it is the fastest way to provide ATP for such acute demands. We can thus wonder if the focus of recent years on aerobic glycolysis as a “hallmark of cancer” is not symptomatic of the lack of attention paid to heterogeneity as well as the difficulty of integrating it into models.

Several studies have shown that the metabolic heterogeneity within tumor cells of the same tissue was an obstacle to the identification of a common metabolic profile in all these cells [13,15]. Moreover, the overall/bulk profile of these tissues remains similar to that of their non-transformed version [18]. If it was possible to predict the tumorigenicity of a cell by its metabolism alone, it would likely be done by considering multiple converging factors rather than just one. Finding a universal target for cancer metabolism would be a huge leap in the search for a therapeutic solution. However, for now, this universal target of metabolism, if it exists, is not yet known, although there may be promising leads, such as a reversed intra/extracellular pH gradient [19–23].

3. How Important Is the Influence of the Tumor Heterogeneity on the Metabolism at the Tissue Scale?

The tumor and environmental heterogeneities have raised increasing interest. The environmental heterogeneity is responsible for many metabolic transitions (lactic acidosis is one example, but hypoxia or nutrient starvation are also often encountered in the most central parts of the tumors). Many theoretical and experimental models try to address the complexity of cancer metabolism, but face difficulty in grasp the huge heterogeneity of cells and microenvironmental conditions. It is important to be cautious about the conclusions drawn from models based on cell populations that are too homogeneous and on global measurements at the tissue scale [24].

Technological advances in the measurement of metabolic parameters at the cell level made possible the identification of very heterogeneous behaviors [13] depending on the cell location in the same tissue and revealed subtle dynamics that do not appear at the whole-tissue scale [25]. This has been confirmed in a study [13] on two cell lines (melanoma and Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)) where single-cell RNA-seq and bulk RNA-seq were compared and showed big differences. In fact, bulk measurements tend to mask differences between cells by averaging expression levels. In this study, variation in oxidative phosphorylation (OXPHOS) activity is the main contributor to the metabolic heterogeneity in both malignant and normal cells and serves as an oxygen availability sensor while stabilizing hypoxia-induced factors (HIFs). The tumor heterogeneity also includes mechanisms of supposed/apparent cooperation between tumor cells, as well as with stromal cells (CAFs) [26], some producing lactate by fermentation, lactate captured and used by others under different extra-cellular conditions, which is named the “reverse Warburg effect” or “two-compartment metabolic coupling”. Temporal heterogeneity is also important. Cells are subjected to variations in oxygenation due to angiogenesis. They occur in the form of cycles, following vascular maturation [27,28].

The quantification of the respective contributions to the metabolism of genetic/epigenetic factors on the one hand and biophysical factors imposed by the environment on the other hand is technically very difficult to obtain. This technical difficulty comes from the lack of data and data heterogeneity, since these two factors are rarely measured together. It is quite possible to imagine that their proportions vary greatly between the tissues from which the tumors originate and from one person to another.

4. Reprogramming or Adaptability?

Let us assume that there is a clearly established program of metabolism by making the analogy with a computer program (i.e., a sequence of instructions that define the entire behavior of a system). In that case, three solutions emerge:

1. The different metabolic scenarios are already part of the “program” as conditional blocks (if–else blocks); therefore, there is no “reprogramming”.
2. Parts of the code are randomly added or deleted, such as random mutations more akin to gain/loss of functions. This is following a classic evolutionary mechanism and not an in-depth transformation of the program itself.
3. The program and its structure are changed deterministically in an optimal way and in a single attempt (copy–paste). Such determinism that evades trials and errors processes is not documented in biology.

It is interesting to note that the first hypothesis belongs to dynamical systems that are predefined by laws and rules. As such, they are fully deterministic. If the cell is a dynamical system, then the program is pre-existing, and therefore, there is no reprogramming, since the structure of the system is unchanged. All the metabolic behaviors in our case are thus accounted for, and they spontaneously emerge according to the external constraints under the form of stable or unstable attractors (including chaotic states).

In opposition to the dynamical systems, the cell can be described as an entity without predefined rules, and therefore, it constantly evolves in the Darwinian sense (second hypothesis). This means that the cell is constitutively unstable (the rules can change), and therefore, it is a non-deterministic system. It functions through trial and error and reaches probabilistic optimality through the law of large numbers under the pressure of the environment.

Is the program of a cancer cell essentially different from that of a normal cell [13]? How many of the changes observed in cancer can be attributed to mutations, altered gene expression, or new routes in metabolic networks, and how many can be attributed to a “natural” change of state inside the metabolic landscape in response to external factors (as in the dynamical system sense)?

It is now well established that cancers all present mutations and modifications of gene expression. The TP53 gene, in particular, which is one of the most frequently mutated genes in tumors, affects the metabolism by inhibiting, in normal cells, the transcription of glucose transporters (Glut1 and Glut4) [29]. The mutation of this gene removes a barrier against a rise in Glut expression found in cancer cells. Many other genes have their expression modulated in cancer, with multiple repercussions on the metabolism: HIF-1 α affects the response to low oxygen concentration [30], and c-Myc enhances cell proliferation, thus increasing metabolic needs [31].

Are genetic mutations the drivers of metabolic modifications of the cell and, thereby, transform the environment? Alternatively, is it the other way around [32], or both? Recently, 28 lysine lactylation sites on histones (K1a) have been identified [33], showing that increased lactate concentration leads to modification of K1a and its associated gene expression. Low pH [34] and surrounding cells subjected to chronic inflammation [35] are known to promote carcinogenesis and DNA damage.

It is difficult to establish a temporal hierarchy of these events and to determine which is first. We are faced with intricate mechanisms that influence each other, and all are potential candidates to be the final “trigger” of cancer. It has been suggested that “metabolic reprogramming” could be a hallmark of metabolism itself and not specific to cancer cells [36]. If metabolic adaptive capacity is inherent in all cells, the specificity of tumor cells might lie in the enhanced ability to do so (by over-expressing potentially pre-existing processes) [13]. Certain behaviors may also never appear for normal cells because the environmental conditions necessary for the appearance of these phenotypes do not occur under physiological conditions. It is not unreasonable to consider metabolic transitions without genetic alteration [37].

This metabolic adaptability should be expressed on several levels of interactions. Intact cells (A in Figure 1) interact with the environment through biochemical processes (secretions, uptakes), and the thermodynamic properties of the enzymes involved allow a first level of regulation. Epigenetics offers a second level of regulation, which adjusts the cell–environment relationship within a (context-dependent) acceptable limit for the cell and the surrounding ones and allows the structural integrity of the environment to be maintained. Some metabolic functions (if not most) are conserved upon mutations (B in Figure 1), and the majority of the regulatory mechanisms that are valid for intact cells are also valid for mutated cells. However, in the context of a mutated cell (C in Figure 1), the cell–environment relationship can, however, be drastically altered. These mutations can increase the expression of ion channels [38] or transporters on the surface of the cell, thus modifying the dynamics of exchanges. Conversely, an altered environment can itself promote mutations within the cell. Metabolic adaptability emerges as a common property of intact and mutated cells in relation to their microenvironment. The notion of “adaptability” is not specific to a particular cell type, even if this capacity can be more or less favored within a specific cell–environment duo.

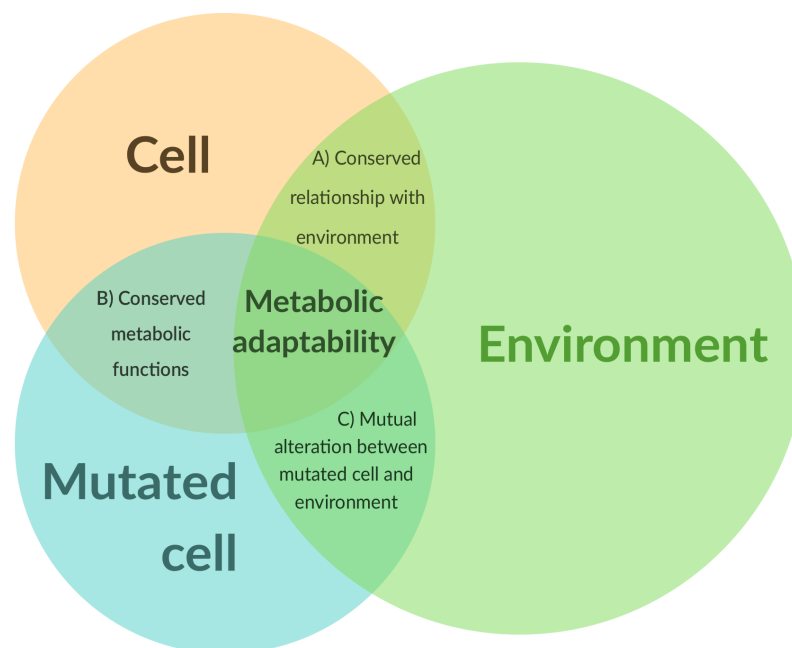


Figure 1. Schematic representation of metabolic adaptability. Metabolic adaptability lies at the interface of the relationship between the cell’s structure and its environment, and is beyond only mutations.

The prevalence of certain states within the metabolic landscape may indicate the presence of attractors without ruling out the possibility of escape. The existence of these attractors could depend on the structure of the cell, as well as on the underlying thermodynamic, biochemical, or biomechanical mechanisms. A recent model of metabolism has been proposed to study its landscapes [39]. The authors described the presence of attractors in large dimensions and showed the possibility of transit from one to others depending on cellular and environmental conditions. According to the authors, a “switch”, as discussed, can be observed in cancer cells, but is the consequence of “non-equilibrium dynamics and thermodynamics” in specific conditions, rather than a direct emergence from the biological perspective.

5. Conclusions

Metabolic reprogramming is a concept frequently used to refer to the metabolic transitions that can take place within tumor cells. This notion seems conceptually well

understood because it echoes the computer culture and is sufficient to illustrate a large part of the observed processes. This poses, however, a first semantic problem, which is to involuntarily give cancer cells an anthropomorphic behavior—a cell able to modify its own code by itself for a specific purpose. This perhaps contributes to the encouragement of the community to focus on the study of tumors at the genetic/epigenetic level at the expense of other levels of molecular interactions, although that tends to change with the rise of new omics [36]. Trans-omics [40], in particular, could be encouraged in the future in order to integrate these different levels of interactions. The second problem is that of clarifying the mechanisms underlying this “reprogramming”. Heterogeneity must be taken into account when the metabolism of a tumor is studied. This makes the identification of key metabolic features difficult. So, more importantly than identifying these features, identifying “cell states” in relation to the environment can help define a metabolic landscape in which cells can transit [39]. It might also be appropriate to distinguish, on the one hand, a cell metabolism, and on the other, a tissue-level metabolism/phenotype. As a tissue, a tumor can present a Warburgian phenotype with a high consumption of glucose and production of lactate, but not necessarily everywhere and all the time at the cell level [13]. Finally, it may be necessary to reintegrate the capacity for the cell to transit within this metabolic landscape, adopting several of these states depending on environmental conditions, by considering its metabolic adaptability, i.e., the set of molecular mechanisms achievable by the cell with or without mutation that allow it to survive in its environment. Can we finally think of the metabolism in a less genocentric manner [36] to include, as the opposite, all of its levels of complexity in a more holistic framework?

Author Contributions: Writing—review and editing, P.J.; Supervision, A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received funding from CNRS-INSERM, Défis Santé Numérique 2019.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

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

References

1. Yoshida, G.J. Metabolic reprogramming: The emerging concept and associated therapeutic strategies. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2015**, *34*, 111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Li, H.; Zhou, J.; Sun, H.; Qiu, Z.; Gao, X.; Xu, Y. CaMeRe: A Novel Tool for Inference of Cancer Metabolic Reprogramming. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 207. [[CrossRef](#)]
3. Cazzaniga, M.; Bonanni, B. Relationship between metabolic reprogramming and mitochondrial activity in cancer cells. Understanding the anticancer effect of metformin and its clinical implications. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 5789–5796. [[PubMed](#)]
4. Carvalho-Santos, Z.; Cardoso-Figueiredo, R.; Elias, A.P.; Tastekin, I.; Baltazar, C.; Ribeiro, C. Cellular metabolic reprogramming controls sugar appetite in *Drosophila*. *Nat. Metab.* **2020**, *2*, 958–973. [[CrossRef](#)]
5. Konopka, A.K. Grand metaphors of biology in the genome era. *Comput. Chem.* **2002**, *26*, 397–401. [[CrossRef](#)]
6. McLeod, C.; Nerlich, B. Synthetic biology, metaphors and responsibility. *Life Sci. Soc. Policy* **2017**, *13*, 13. [[CrossRef](#)]
7. Boudry, M.; Pigliucci, M. The mismeasure of machine: Synthetic biology and the trouble with engineering metaphors. *Stud. Hist. Philos. Sci. Part C Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* **2013**, *44*, 660–668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Xie, J.; Wu, H.; Dai, C.; Pan, Q.; Ding, Z.; Hu, D.; Ji, B.; Luo, Y.; Hu, X. Beyond Warburg effect - Dual metabolic nature of cancer cells. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Frezza, C. Metabolism and cancer: The future is now. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 133–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Zhou, S.T.; Huang, C.H.; Wei, Y.Q. The metabolic switch and its regulation in cancer cells. *Sci. China Life Sci.* **2010**, *53*, 942–958. [[CrossRef](#)]
11. DeBerardinis, R.J.; Chandel, N.S. We need to talk about the Warburg effect. *Nat. Metab.* **2020**, *2*, 127–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Murphy, M.P.; O’Neill, L.A. How should we talk about metabolism? *Nat. Immunol.* **2020**, *21*, 713–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Xiao, Z.; Dai, Z.; Locasale, J.W. Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **1956**, *123*, 309–314. [[CrossRef](#)]

15. Faubert, B.; Solmonson, A.; DeBerardinis, R.J. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science* **2020**, *368*, eaaw5473. [[CrossRef](#)]
16. Dienel, G.A.; Cruz, N.F. Aerobic glycolysis during brain activation: Adrenergic regulation and influence of norepinephrine on astrocytic metabolism. *J. Neurochem.* **2016**, *138*, 14–52. [[CrossRef](#)]
17. Jones, W.; Bianchi, K. Aerobic glycolysis: Beyond proliferation. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 227. [[CrossRef](#)]
18. Pacheco, M.P.; Bintener, T.; Ternes, D.; Kulms, D.; Haan, S.; Letellier, E.; Sauter, T. Identifying and targeting cancer-specific metabolism with network-based drug target prediction. *EBioMedicine* **2019**, *43*, 98–106. [[CrossRef](#)]
19. Persi, E.; Duran-Frigola, M.; Damaghi, M.; Roush, W.R.; Aloy, P.; Cleveland, J.L.; Gillies, R.J.; Ruppin, E. Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy. *Nat. Commun.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
20. Damaghi, M.; Wojtkowiak, J.W.; Gillies, R.J. pH sensing and regulation in cancer. *Front. Physiol.* **2013**, *4*, 370. [[CrossRef](#)]
21. White, K.A.; Grillo-Hill, B.K.; Barber, D.L. Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance. *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 663–669. [[CrossRef](#)]
22. Luo, X.; Yang, H.; Wang, H.; Ye, Z.; Zhou, Z.; Gu, L.; Chen, J.; Xiao, Y.; Liang, X.; Qian, X.; et al. Highly Sensitive Hill-Type Small-Molecule pH Probe That Recognizes the Reversed pH Gradient of Cancer Cells. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 5803–5809. [[CrossRef](#)]
23. Jin, M.Z.; Jin, W.L. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduct. Targeted Ther.* **2020**, *5*, 166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Strickaert, A.; Saiselet, M.; Dom, G.; De Deken, X.; Dumont, J.E.; Feron, O.; Sonveaux, P.; Maenhaut, C. Cancer heterogeneity is not compatible with one unique cancer cell metabolic map. *Oncogene* **2017**, *36*, 2637–2642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Damiani, C.; Maspero, D.; Di Filippo, M.; Colombo, R.; Pescini, D.; Graudenzi, A.; Westerhoff, H.V.; Alberghina, L.; Vanoni, M.; Mauri, G. Integration of single-cell RNA-seq data into population models to characterize cancer metabolism. *PLoS Comput. Biol.* **2019**, *15*, e1006733. [[CrossRef](#)]
26. Sonveaux, P.; Végran, F.; Schroeder, T.; Wergin, M.C.; Verrax, J.; Rabbani, Z.N.; De Saedeleer, C.J.; Kennedy, K.M.; Diepart, C.; Jordan, B.F.; et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Investig.* **2008**, *118*, 3930–3942. [[CrossRef](#)]
27. Dewhirst, M.W.; Cao, Y.; Moeller, B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 425–437. [[CrossRef](#)]
28. Dewhirst, M.W. Relationships between cycling hypoxia, HIF-1, angiogenesis and oxidative stress. *Radiat. Res.* **2009**, *172*, 653–665. [[CrossRef](#)]
29. Phan, L.M.; Yeung, S.C.J.; Lee, M.H. Cancer metabolic reprogramming: Importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biol. Med.* **2014**, *11*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Orang, A.V.; Petersen, J.; McKinnon, R.A.; Michael, M.Z. Micromanaging aerobic respiration and glycolysis in cancer cells. *Mol. Metab.* **2019**, *23*, 98–126. [[CrossRef](#)]
31. Morrish, F.; Neretti, N.; Sedivy, J.M.; Hockenbery, D.M. The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1054–1066. [[CrossRef](#)]
32. Intlekofer, A.M.; Finley, L.W. Metabolic signatures of cancer cells and stem cells. *Nat. Metab.* **2019**, *1*, 177–188. [[CrossRef](#)]
33. Zhang, D.; Tang, Z.; Huang, H.; Zhou, G.; Cui, C.; Weng, Y.; Liu, W.; Kim, S.; Lee, S.; Perez-Neut, M.; et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature* **2019**, *574*, 575–580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kumareswaran, R.; Ludkovski, O.; Meng, A.; Sykes, J.; Pintilie, M.; Bristow, R.G. Chronic hypoxia compromises repair of DNA double-strand breaks to drive genetic instability. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 189–199. [[CrossRef](#)]
35. Balkwill, F.; Mantovani, A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet* **2001**, *357*, 539–545. [[CrossRef](#)]
36. Medina, M.Á. Metabolic Reprogramming is a Hallmark of Metabolism Itself. *BioEssays* **2020**, *42*, 2000058.
37. Marine, J.C.; Dawson, S.J.; Dawson, M.A. Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20*, 743–756. [[CrossRef](#)]
38. Lastraioli, E.; Iorio, J.; Arcangeli, A. Ion channel expression as promising cancer biomarker. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2015**, *1848*, 2685–2702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Li, W.; Wang, J. Uncovering the Underlying Mechanisms of Cancer Metabolism through the Landscapes and Probability Flux Quantifications. *iScience* **2020**, *23*, 101002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Yugi, K.; Kuroda, S. Metabolism-Centric Trans-Omics. *Cell Syst.* **2017**, *4*, 19–20. [[CrossRef](#)]

1 Modelling the role of HIF in the regulation of metabolic key
2 genes LDH and PDH: Emergence of Warburg Phenotype.

3 Kévin SPINICCI^{1,2}, Pierre JACQUET¹, Gibin POWATHIL², and Angélique
4 STEPHANOU¹

5 ¹Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, TIMC, 38000
6 Grenoble, France

7 ²Department of Mathematics - Swansea University

8 May 2022

9 **Abstract**

10 Oxygenation of tumours and the effect of hypoxia in cancer cell metabolism is a widely studied
11 subject. Hypoxia Inducible Factor (HIF), the main actor in the cell response to hypoxia, represents
12 a potential target in cancer therapy. HIF is involved in many biological processes such as cell pro-
13 liferation, survival, apoptosis, angiogenesis, iron metabolism and glucose metabolism. This protein
14 regulates the expressions of Lactate Dehydrogenase (LDH) and Pyruvate Dehydrogenase (PDH),
15 both essential for the conversion of pyruvate to be used in aerobic and anaerobic pathways. HIF
16 upregulates LDH, increasing the conversion of pyruvate into lactate which leads to higher secretion of
17 lactic acid by the cell and reduced pH in the microenvironment. HIF indirectly downregulates PDH,
18 decreasing the conversion of pyruvate into Acetyl Coenzyme A which leads to reduced usage of the
19 Tricarboxylic Acid (TCA) cycle in aerobic pathways. Upregulation of HIF may promote the use of
20 anaerobic pathways for energy production even in normal extracellular oxygen conditions. Higher use
21 of glycolysis even in normal oxygen conditions is called the Warburg effect. In this paper, we focus
22 on HIF variations during tumour growth and study, through a mathematical model, its impact on
23 the two metabolic key genes PDH and LDH, to investigate its role in the emergence of the Warburg
24 effect. Mathematical equations describing the enzymes regulation pathways were solved for each
25 cell of the tumour represented in an agent-based model to best capture the spatio-temporal oxygen
26 variations during tumour development caused by cell consumption and reduced diffusion inside the
27 tumour. Simulation results show that reduced HIF degradation in normoxia can induce higher lactic
28 acid production. The emergence of the Warburg effect appears after the first period of hypoxia before
29 oxygen conditions return to a normal level. The results also show that targeting the upregulation of
30 LDH and the downregulation of PDH could be relevant in therapy.

31 Introduction

32 Cells rely on two main processes to produce ATP: Oxidative Phosphorylation (OXPHOS) by using oxygen,
33 and glycolysis by using glucose. Glycolysis is a pathway generating both ATP and pyruvate using glucose
34 as input [1, 2, 3]. Pyruvate produced by glycolysis can then be used to fuel the Tricarboxylic Acid
35 (TCA) cycle and produce the compounds involved in OXPHOS, the aerobic pathway. If oxygen is not
36 present, pyruvate is turned into lactate, this process is called fermentation [4]. Lactate formed during
37 fermentation is secreted into the microenvironment which causes a decrease in extracellular pH.

38 In 1927, Otto Warburg observed that the tumour consumed more glucose and produced more lactic
39 acid than normal tissues [5]. At first Warburg's observation did not consider the presence of oxygen,
40 yet since increased lactic acid production was also observed when oxygen is available, it has slowly been
41 associated with aerobic glycolysis [6]. Nowadays, high rate of glycolysis, even if oxygen is available, is
42 known as the Warburg Effect [7, 8]. In this paper, we will retain this definition. Tumours can develop
43 anywhere, yet harsh conditions favour tumour appearance [9]. Most tumours have median oxygen levels
44 falling below 2%, the threshold at which the hypoxic response is half-maximal [10]. For this reason,
45 a lot of interest has been put in the effect of oxygenation on tumour metabolism and specifically on
46 the Hypoxia Inducible Factor (HIF) protein. This protein, being the main actor in the cell response to
47 hypoxia, is interesting to explore as a potential target for cancer therapy since hypoxic cells are more
48 radioresistant [10, 7].

49 HIF Structure and Mechanism of action

50 The HIF protein was discovered by Semenza and co-workers during a study on the erythropoietin (EPO)
51 gene, a gene encoding for the erythropoietin hormone involved in red blood cells production, in 1991
52 [11]. They found DNA sequences in the gene important for its transcriptional activation in hypoxic
53 conditions, now called Hypoxia Response Elements (HRE). The HIF protein is a heterodimer composed
54 of two subunits HIF-1 α and HIF-1 β , it acts as a transcription factor by binding to HRE in hypoxic
55 conditions. The subunit HIF-1 α is oxygen-sensitive and degraded in presence of oxygen, compared to the
56 constitutively expressed HIF-1 β subunit. Three isoforms of the α subunit have been identified: HIF-1 α ,
57 HIF2- α and HIF3- α . HIF-1 α and HIF2- α are the most studied of the three homologs, HIF-1 α is expressed
58 ubiquitously in the body while HIF2- α expression is tissue-specific [11]. It has been demonstrated that
59 overexpression or suppression of HIF-1 α or HIF2- α influence each other *in vitro* and one homolog can
60 be more expressed than the other. Kidney lesions with early VHL inactivation show more activation of
61 HIF-1 α than HIF-2 α but this balance can change [12]. Transcriptional activity of HIF-1 α requires the
62 binding of the co-factor CBP/p300 to the C-TAD domain of HIF-1 α , then HIF will bind to HRE and
63 activate the transcription of its target genes [11, 13, 14].

64 HIF regulation

65 Oxygen-dependent regulation of HIF-1 α is mainly done by Prolyl Hydroxylase (PHD) and FIH-1 en-
66 zymes. They act at the posttranslational level by inducing its degradation or disrupting its interaction

67 with co-factors. Prolyl Hydroxylase (PHD) proteins catalyze the hydroxylation of proline residues, tar-
68 geting HIF-1 α for proteasomal degradation by the Von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor protein.
69 Hydroxylation of asparagine residues by Factor Inhibiting HIF-1 (FIH-1) inhibits the interaction between
70 HIF-1 α and the important co-factor CBP/p300, preventing regulation of HIF-1 α target genes. Since
71 PHD and FIH-1 need oxygen to hydroxylate HIF-1 α residues, they act as oxygen sensors in the cell
72 response to hypoxia. Hypoxia promotes HIF-1 α protein stability and transcriptional activity. Reactive
73 Oxygen Species (ROS) and oncometabolites such as succinate, fumarate, lactate upregulate HIF-1 α [14].

74 Oxygen-independent mechanisms regulating HIF-1 α transcription and translation include PI3K/Akt/
75 mTOR and RAS/RAF/MEK/ERK pathways. Multiple growth factors, oncogenes, mutations (such as
76 in the tumour suppressor genes PTEN and p53) or ROS may increase HIF-1 α levels through PI3K and
77 RAS signalling cascade [14, 11, 13]. A study by The Cancer Genome Atlas (TCGA) identified the most
78 altered genes in glioblastoma, it reveals that RTK/RAS/PI3K are among the frequently altered pathways
79 in this disease [15]. It suggests that HIF is a strong candidate for cancer therapy, not only because of
80 its role in the cellular response to hypoxia but also for its frequent deregulation in cancer as well. HIF
81 regulation is summarized in figure 1.

82 **Impact on cellular biological functions**

83 The cell response to hypoxia initiated by HIF affects many biological processes such as cell proliferation,
84 survival, apoptosis, angiogenesis, iron metabolism and glucose metabolism [13]. Pathway enrichment
85 analysis of 98 HIF target genes revealed 20 pathways including those implicated in cancer, glycoly-
86 sis/gluconeogenesis and metabolism of carbohydrates [16].

87 HIF can prevent G1/S transition through the regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors (p21,
88 p27) and cyclin proteins (cyclin G2, cyclin E) [17]. Cyclin E downregulation is mediated through the
89 inhibition of cyclin D by HIF causing a slowing down or arrest of the cell cycle in the G1 phase and
90 promoting the entry into quiescence, which can be a mechanism to escape chemotherapy [18].

91 The Tricarboxylic Acid (TCA) cycle (also called Citric Acid or Krebs Cycle) is a circular process fueled
92 by AcetylCoA generating NADH and FADH₂ for its use in the Oxidative Phosphorylation (OXPHOS)
93 pathway. Although OXPHOS is the main pathway generating ATP, TCA produce energy in the form of
94 GTP (equivalent of ATP). These processes represent the aerobic pathways used by the cell when oxygen
95 is present for ATP production. Pyruvate produced by the last steps of the glycolysis is turned into
96 Acetyl Coenzyme A by Pyruvate Dehydrogenase (PDH) to fuel the TCA cycle, promoting an oxidative
97 metabolism [4, 19]. However, Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDK) an inhibitor of PDH is upregulated
98 by HIF [20].

99 When oxygen is not present, the Lactate Dehydrogenase (LDH) enzyme catalyze the reaction in
100 which pyruvate formed by the glycolysis is turned into lactate to generate NAD⁺. This last step allows
101 glycolysis to continue in anaerobic condition since NAD⁺ is required for pyruvate production. In presence
102 of oxygen, NAD⁺ availability is ensured by OXPHOS [4, 19].

103 Different isoforms of both LDH and PDH enzymes exist. Those isoforms present several differences
104 like kinetics parameters, the tissue or the cellular compartment where the isoforms is expressed. For

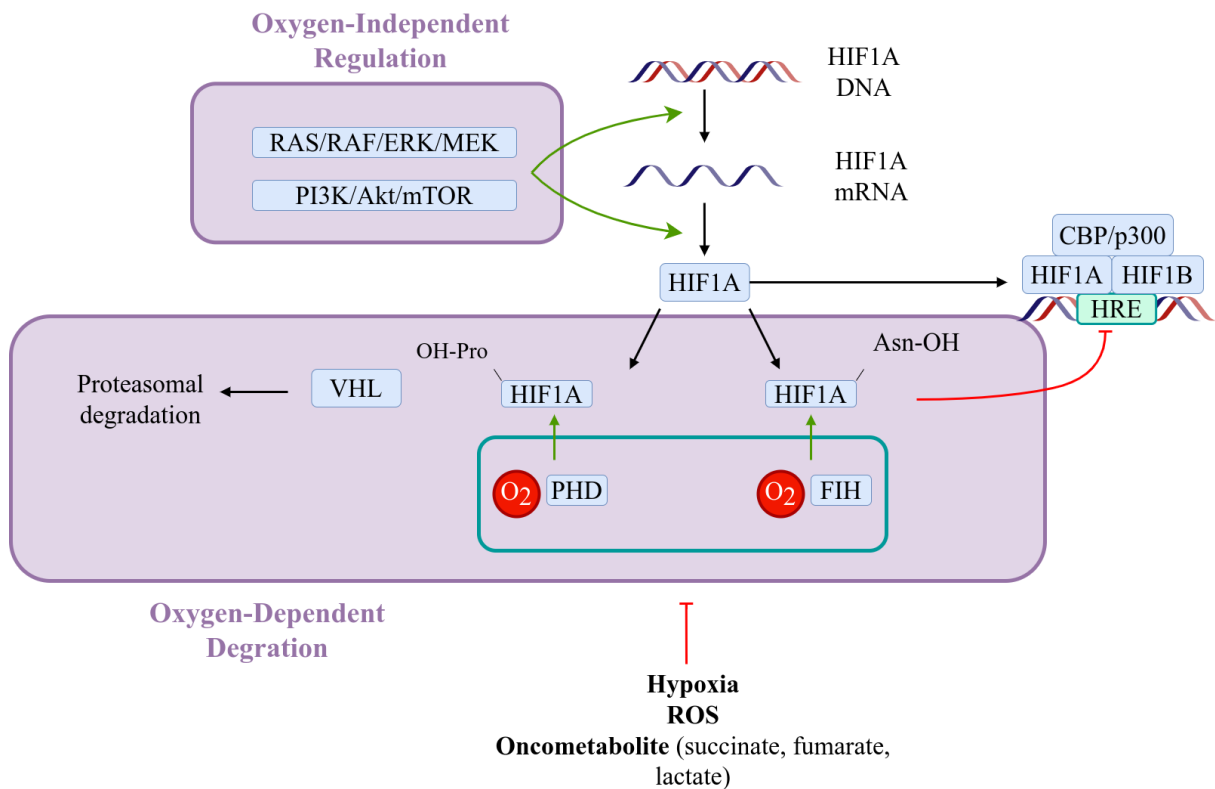


Figure 1: Regulation of Hypoxia Inducible Factor by oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms. PI3K/Akt/mTOR and RAS/RAF/ERK/MEK signalling pathways increase HIF transcription and translation in an oxygen-independent way. The oxygen-dependent regulation relies mainly on the two enzymes: PHD and FIH-1. PHD catalyzes the oxygen-dependent hydroxylation of proline residues on the HIF protein, which is then targeted for proteasomal degradation by the VHL. FIH-1 catalyzes the oxygen-dependent hydroxylation of asparagine residues, which inhibits the interaction between the HIF protein and the CBP/p300 co-factor. Hydroxylation of HIF residues by PHD and FIH-1 is inhibited by hypoxia, ROS and oncometabolites such as succinate, fumarate and lactate.

105 example, LDH-A is expressed in the skeletal muscle LDH-B in heart [21]. LDH-A is also the isoform
 106 comonly upregulated in cancer [22]. The differences between isoforms add a level of complexity. However,
 107 this is out of the scope of this study.

108 The Warburg effect is caused by an increase in glucose utilization by the cells, the glycolysis being
 109 one of the pathways affected by hypoxia. HIF increases the expression of glucose transporters GLUT1
 110 and GLUT3 which contain HRE in their promoters, resulting in higher glucose uptake [23]. Furthermore,
 111 HIF induces the overexpression of specific glycolytic isoforms for each enzyme involved in all the steps
 112 of the glycolysis [21]. Thus, HIF upregulates the expression of LDH, resulting in higher lactate secretion
 113 which acidifies the microenvironment. Not only hypoxia will increase the use of glycolysis by the cell,
 114 but it will also reduce the use of TCA cycle.

115 In this paper, we want to study how genetic (or epigenetic) regulations, between HIF and its two
 116 targets LDH and PDH, may affect the emergence of the Warburg effect. The Warburg effect results in
 117 an increased production of lactic acid by the tumour by metabolizing glucose, even in normoxia [24, 7,
 118 8, 25, 26].

119 Material and Method

120 Genetic Regulations

121 Here, we assume that HIF plays a major role in mediating the cell response to hypoxia. We have
 122 selected LDH and PDH to model the effect of hypoxia on metabolism since (1) they are key enzymes
 123 for the conversion of pyruvate into lactate/AcetylCoA respectively after the glycolysis, and (2) they are
 124 both regulated by HIF directly or indirectly. PDH is downregulated by HIF through its inhibitor PDK,
 125 therefore PDK will be included in the model (see figure 2). Genetic regulations are based on the model
 126 described by Li *et al* [20]. All genetic regulations are described by the following equations:

$$\frac{du}{dt} = A_u - D_u \times H_{O_2 \rightarrow u} \times u \quad (1)$$

$$\frac{dv}{dt} = A_v \times H_{u \rightarrow v} - D_v \times v \quad (2)$$

$$\frac{dw}{dt} = A_w \times H_{u \rightarrow w} - D_w \times w \quad (3)$$

$$\frac{dz}{dt} = A_z \times H_{w \rightarrow z} - D_z \times z \quad (4)$$

127 where u , v , w and z are HIF, LDH, PDK and PDH levels, respectively; A is a parameter for gene
 128 production and D for gene degradation. LDH and PDK upregulations by HIF and PDH downregulations
 129 by PDK are described with a non-linear function named the shifted-Hill function. In the same way, the
 130 increased HIF protein degradation in normoxia is described using the same function. The shifted-Hill
 131 function has the form:

$$H_{Y \rightarrow Z} = \frac{S^n}{S^n + Y^n} + \gamma_{Y \rightarrow Z} \frac{Y^n}{S^n + Y^n}. \quad (5)$$

132 Here, n is the Hill coefficient. S is the gene level with a half-threshold of production. The positive
 133 parameter γ represents an activation if > 1 or an inhibition if < 1 . $H_{Y \rightarrow Z}$ represents the effect of the

Parameter	Value	Dimension	Parameter	Value	Dimension
A_u	0.05	1/min	D_u	0.005	1/min
A_v	0.005	1/min	D_v	0.005	1/min
A_w	0.005	1/min	D_w	0.005	1/min
A_z	0.005	1/min	D_z	0.005	1/min
$S_{O_2 \rightarrow u}$	0.02085	mmol/L	$S_{u \rightarrow v}$	4.48	-
$S_{u \rightarrow w}$	5.0	-	$S_{w \rightarrow z}$	2.2	-
$\gamma_{O_2 \rightarrow u}$	10.0	-	$\gamma_{u \rightarrow v}$	3.61	-
$\gamma_{u \rightarrow w}$	6.97	-	$\gamma_{w \rightarrow z}$	0.14	-

Table 1: Parameters used in genetics regulations. The symbol "-" stands for dimensionless.

134 regulating gene Y on the regulated gene Z , it can be an upregulation if γ is > 1 , or a downregulation if
135 γ is < 1 . All genes levels are dimensionless, parameters used in the equation above are summarised in
136 table 1.

137 Cell Metabolism

Nutrient consumption rates change over time depending on microenvironment conditions. In normoxia, glycolysis transforms glucose to pyruvate, then pyruvate is converted to AcetylCoA by PDH enzymes to feed the TCA cycle. The TCA cycle works in cooperation with OXPHOS to produce ATP using oxygen, which constitutes the aerobic pathway [19]. Since the conversion of pyruvate to AcetylCoA is catalyzed by the PDH enzyme, its availability bounds the use of TCA and should be reflected in the consumption of oxygen. In hypoxia, glucose consumption is increased to produce the ATP needed using aerobic pathways. Pyruvate formed by glycolysis is then turned into lactate by LDH enzymes, increasing acidity in the microenvironment [19]. Like PDH, increased LDH levels should reflect an increased usage of anaerobic pathways with higher consumption of glucose. As PDH and LDH play an important role in the fate of pyruvate, their respective levels should impact cells metabolism in our model.

In equations 6 and 7, we define p_O and p_G , two terms to describe the impact of LDH and PDH on glucose and oxygen consumptions using a sigmoid function based on the logistic function. p_O and p_G will adjust the consumptions rates of oxygen and glucose defined in equations 8 and 9, by increasing or decreasing the maximal rates according to the level of PDH and LDH.

$$p_O = \frac{\phi_O - \psi_O}{1 + \exp(-l_z(z - z_0))} + \psi_O \quad (6)$$

$$p_G = \frac{\phi_G - \psi_G}{1 + \exp(-l_v(v - v_0))} + \psi_G \quad (7)$$

138 Here, ϕ_O and ϕ_G are the maximal values for p_O and p_G . ψ_O and ψ_G are the minimal values for p_O and
139 p_G . z and v are the current level of PDH and LDH. z_0 and v_0 represent the midpoint of p_O and p_G . l_z
140 and l_v represent the steepness of the curve for p_O and p_G .

141 Cells consumption and production are described following the functions from the model defined by [27]
142 (a brief description of the complete model is available in supplementary material).

143 Oxygen consumption is determined using a Michaelis-Menten function [27]:

$$f_O = p_O V_O \frac{O_e}{O_e + K_O} \quad (8)$$

144 PDH allows the pyruvate to enter the TCA cycle as Acetyl Coenzyme A, it is a limiting step in the aerobic
 145 pathway. This is included in the model by adjusting the maximum oxygen consumption rate V_O using the
 146 term p_O to represent PDH level effect on metabolism. O_e is the extracellular oxygen concentration. K_O
 147 is the extracellular oxygen concentration at which the cell oxygen consumption rate is half-maximum.

148 Following Robertson-Tessi *et al* [27], we assume that ATP demand drives glucose consumption. In low
 149 oxygen conditions, the cell will consume more glucose to produce ATP in the last step of the glycolysis,
 150 then pyruvate is turned into lactate by the LDH enzyme. An increase of LDH indicates an upregulation
 151 of anaerobic pathways which means here, an increase in glucose consumption. We use the term p_G to
 152 increase glucose consumption in the equation 9 when levels of LDH increase [27].

$$f_G = \left(\frac{p_G A_0}{2} - \frac{29 f_O}{10} \right) \frac{G_e}{G_e + K_G} \quad (9)$$

153 A_0 is the target ATP production. G_e is the extracellular glucose concentration. K_G is the extracellular
 154 glucose concentration at which the glucose consumption rate is half-maximal.

155 In this paper, we are studying how HIF can impact the interplay between aerobic (TCA + OXPHOS) and
 156 anaerobic (glycolysis + lactate secretion) pathways to generate ATP, due to its PDH and LDH enzymes
 157 important for conversion of pyruvate. Therefore, we do not directly model aerobic and anaerobic pathways
 158 but rather we compute the theoretical level of ATP generated by both processes (equation 12). We take
 159 the same stoichiometric coefficients as in [27]: glycolysis uses 1 mole of glucose produces 2 moles of ATP,
 160 aerobic pathway uses 1 mole of glucose and 5 moles of oxygen to produce 29 moles of ATP. We can
 161 compute the ATP produced from the nutrients consumed using the yield from glycolysis and aerobic
 162 pathway [27]:

$$f_A = 2f_G + \frac{29f_O}{5} \quad (10)$$

163 Glycolysis produces 2 moles of pyruvate with 1 mole of glucose. If oxygen is absent, pyruvate is turned
 164 into lactate, giving a total of 2 moles of lactate [4]. Lactic acid production is given by the glucose
 165 consumed:

$$f_{H^+} = k_H 2f_G \quad (11)$$

k_H is a fixed parameter for proton buffering (dimensionless).

Quantity of ATP produced by the cell is modelled by an ODE, and extracellular quantities of the three
 molecules oxygen (O), glucose (G) and protons (H^+) are described by PDEs in the following equations:

$$\frac{dA}{dt} = f_A \quad (12)$$

$$\frac{\partial O}{\partial t} = D_O \nabla^2 O - \sum_{k=1}^{N_i} f_O^k \quad (13)$$

$$\frac{\partial G}{\partial t} = D_G \nabla^2 G - \sum_{k=1}^{N_i} f_G^k \quad (14)$$

$$\frac{\partial H^+}{\partial t} = D_{H^+} \nabla^2 H^+ + \sum_{k=1}^{N_i} f_{H^+}^k \quad (15)$$

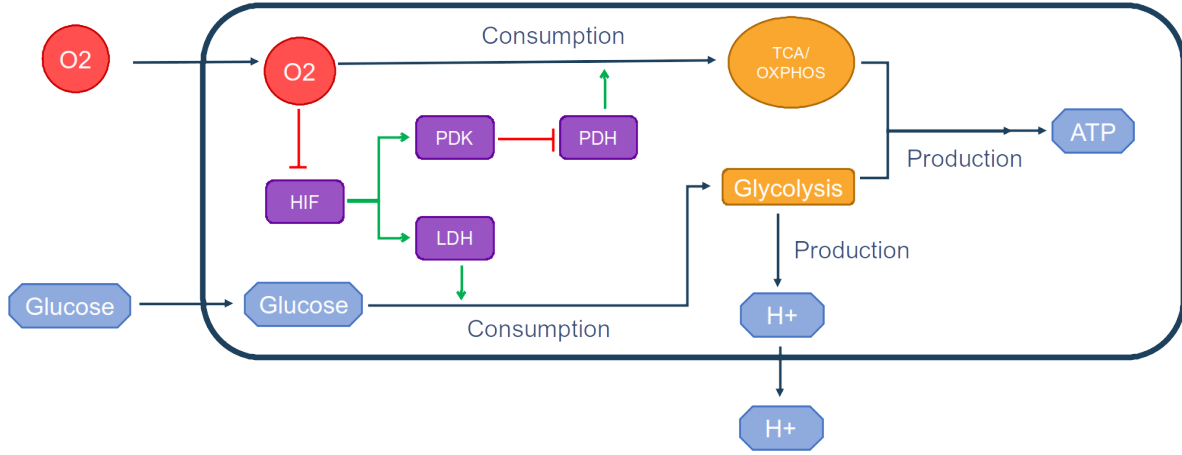


Figure 2: Cell metabolism and genetic regulations implemented in the model. Green arrows represent upregulation, red arrows represent inhibition.

166 D_O , D_G and D_{H^+} are the diffusion coefficient for each molecules. N_i is the number of cells in the
 167 voxel i . Initial values for oxygen in equation 13 are $O(x, y, 0) = 0.056$ mmol/L in normoxia and 0.012
 168 mmol/L in hypoxia. Initial value for glucose in equation 14 is $G(x, y, 0) = 5.0$ mmol/L. Initial value for
 169 protons in equation 15 is $H^+(x, y, 0) = 3.98 \cdot 10^{-5}$ mmol/L (pH 7.4). Let x_0 and y_0 the lower boundary
 170 of the domain in x and y , x_L and y_L the upper boundary in x and y . Boundary values for oxygen in
 171 equation 13 are $O(x_0, y, t) = O(x_L, y, t) = O(x, y_0, t) = O(x, y_L, t) = 0.056$ mmol/L in normoxia and
 172 0.012 mmol/L in hypoxia. Boundary values for glucose in equation 14 are $G(x_0, y, t) = G(x_L, y, t) =$
 173 $G(x, y_0, t) = G(x, y_L, t) = 5.0$ mmol/L. Boundary values for H^+ in equation 15 are $H^+(x_0, y, t) =$
 174 $H^+(x_L, y, t) = H^+(x, y_0, t) = H^+(x, y_L, t) = 3.98 \cdot 10^{-5}$ mmol/L (pH 7.4). Parameters used in those
 175 functions are summarised in Table 2. The schematic in figure 2 shows the cellular metabolism and the
 176 genetics regulation implemented in the model.

177 Numerical Implementation

178 The tumour microenvironment plays a vital role in the growth and progression of tumour cells. As the
 179 tumour grows, intracellular and intercellular interactions influence the changes in its microenvironment,
 180 which can further result in cells dynamic. Here, we aim to develop a modelling framework to simulate the
 181 growth of a large population of cells cultured *in vitro*, each cell having its metabolism influenced by the
 182 microenvironment conditions to represent accurately the resources dynamics in the tumour. Therefore,
 183 the numerical implementation of the model must have sufficient performance to simulate the behaviour
 184 of thousands of cells. In this regard, we selected Physicell, an open-source C++ framework designed
 185 to run simulations containing a large population of cells. This framework has good performance with a
 186 low memory footprint, allows the user to implement his custom code and define custom cell types, run a
 187 multi-agent-based simulation in 2D or 3D [28].

188 Most aspect of the model are handled by the physicell software [28], this includes : cell division and
 189 progression through the cell cycle, cell adhesion and repulsion, substrate diffusion, cell exchanges with

Parameter	Value	Unit
V_O	0.01875	mmol/L/min
K_O	0.0075	mmol/L
K_G	0.04	mmol/L
k_H	2.5e-4	-
A_0	0.10875	mmol/L/min
ϕ_G	50	-
ψ_G	1	-
l_G	4	-
v_0	2.35	-
ϕ_O	1	-
ψ_O	0	-
l_O	15	-
z_0	0.575	-
D_O	109,200	$\mu\text{m}^2/\text{min}$
D_G	30,000	$\mu\text{m}^2/\text{min}$
D_{H^+}	27,0000	$\mu\text{m}^2/\text{min}$

Table 2: Parameters for metabolism. The symbol "-" stands for dimensionless.

190 the environment (secretion and consumption). Cells are modelled with the shape of a sphere that cannot
191 deform, adhesion and repulsion are implemented using a potential function. The cell division process is
192 implemented as a cycle, where the user can define each steps and and progression between them. There
193 is no condition on the neighbourhood, a cell will divide even if it is surrounded by other cells as long
194 as there is sufficient nutrient. As a consequence, certain regions of the tumour will exhibit a higher cell
195 density. We implemented in Physicell an heterogeneous diffusion with respect to local cellular density.
196 In the model, phases duration are 5h in G1, 8h in S, 4h in G2 and 1h in M, for a total of 18h to complete
197 a cell cycle [29].

198 Here, the impact of extracellular oxygen concentration is studied considering different boundary con-
199 ditions: physiological normoxia at 0.056 mmol/L (5% O_2), pathological hypoxia at 0.01112 mmol/L (1%
200 O_2) and a last where boundary conditions are modified during the simulation from physiological normoxia
201 to pathological hypoxia. The hypoxia threshold is set at 0.02085 (2% O_2), the level at which HIF has a
202 half-maximal response [10].

203 The governing ODEs (equation 1 - 4 and 12) and PDEs (equation 13 - 15) are run at each timestep to
204 compute cell nutrient consumption, energy and acidity production for that period. After each time step,
205 the cell state is updated according to the quantity of ATP generated and the extracellular pH. Therefore,
206 cells can proliferate and divide only if they were able to generate enough ATP and if extracellular pH
207 is higher than the acid resistance of the cell (6.1 [27]). If the quantity of ATP generated is less than a
208 threshold $ATP_{\text{quiescence}}$, the cell enters quiescence and is then prevented to complete the G1 phase. If the

209 quantity of ATP generated is less than a threshold ATP_{death} or if the pH is less than a threshold pH_{death} ,
210 the cell dies and enters into the death cycle where it is progressively removed from the microenvironment
211 by lysis.

212 To simulate the cell entry into quiescence, we created a phase G0 with a reversible link to the G1
213 phase of the cell cycle. If the condition for proliferation are not met, we set the transition rate from G1
214 to G0 at a maximum value and the rate from G0 to G1 at 0. The cell is forced to enter the G0 phase
215 and is prevented to transit to the G1 phase to continue its division. Once the level of ATP rises again,
216 we revert the transition rates values to allow the cell to leave the G0 phase and divide anew. The cell
217 can only transit to the G0 phase from the G1 phase, thus it will complete its cycle once it leaved the G1
218 phase and will divide even if ATP levels fall while the division process is ongoing.

219 Results

220 Qualitative exploration of the model at the cell scale

221 A well-known phenomenon is the Warburg effect, increased production of lactic acid by the tumour [5]
222 even in normoxia [24, 7, 8]. A qualitative study of the genetic deregulations at the cell scale would reveal
223 how it impacts lactic-acid production to investigate the appearance of the Warburg effect. The primary
224 aim of this study is to investigate the role of genetic regulations in cell metabolic changes.

225 In our mathematical model, the regulating effect of a gene on another is mainly driven by the γ
226 parameter in the shifted-Hill function. Setting this parameter equal to 1 simulate a loss of the regulating
227 function. An over-sensitivity of a gene by its regulator is modelled by setting the γ parameter to 40, the
228 maximum defined in the model from [20]. Results of a few regulations are shown in figure 3.

229 When no genetic deregulations are applied to the model (figure 3.A), protons production range from
230 0.0001 mmol/L/min to 0.001 mmol/L/min with normal γ parameters. Around 0.01 mmol/L oxygen
231 (1%), the cell progressively increases its H^+ secretion rate from 0.0001 mmol/L/min to the maximum
232 0.001 mmol/L/min.

233 In our model, when HIF is not subjected to oxygen degradation (figure 3.B), the rate of H^+ production
234 is only influenced by glucose concentration. In this case, cell's lactic-acid secretion rate can reach 0.001
235 mmol/L/min even in normal oxygen pressure, as a result of the Warburg effect. Increased degradation of
236 HIF in oxygen (figure 3.C) reduces the oxygen threshold at which the cell has a lactic-acid secretion rate
237 of 0.001 mmol/L/min. Lower levels of oxygen are needed to reach the maximal secretion rate compared
238 to the normal degradation rate of HIF. With no deregulation (figure 3.A), the lactic-acid secretion rate
239 starts to increase at around 0.019 mmol/L of oxygen and reach a maximum at around 0.08 mmol/L.
240 With increased HIF degradation by oxygen (figure 3.C), this span is reduced and lactic-acid secretion
241 increases at around 0.012 mmol/L of oxygen. Similar to our result, a model from [25] shows that a lower
242 degradation rate of HIF increases the chance that cells use glycolysis instead of OXPHOS, which will
243 increase lactic acid secretions.

244 Inhibiting LDH sensitivity to HIF (figure 3.D) causes the maximum lactic-acid secretion rate to fall
245 to 0.0008 mmol/L/min. Increasing LDH sensitivity to HIF does not permit the cell to have a higher

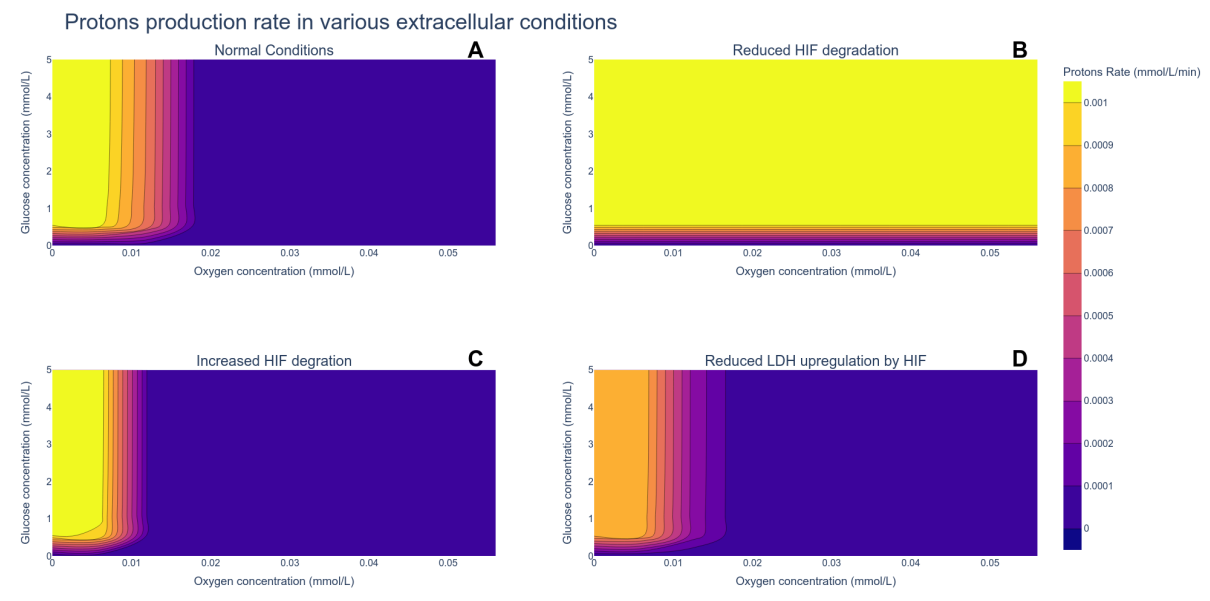


Figure 3: Influence of genetic upregulation or inhibition on the production rate of protons at different glucose and oxygen concentrations. (A) Result with no genetic deregulation. ($\gamma_{O_2 \rightarrow u} = 10.0$, $\gamma_{u \rightarrow v} = 3.61$, $\gamma_{u \rightarrow w} = 6.97$, $\gamma_{w \rightarrow z} = 0.14$) (B) Result with inhibition of the oxygen-dependant degradation of HIF. ($\gamma_{O_2 \rightarrow u} = 1.0$, $\gamma_{u \rightarrow v} = 3.61$, $\gamma_{u \rightarrow w} = 6.97$, $\gamma_{w \rightarrow z} = 0.14$) (C) Result with over-degradation of HIF by oxygen. ($\gamma_{O_2 \rightarrow u} = 40.0$, $\gamma_{u \rightarrow v} = 3.61$, $\gamma_{u \rightarrow w} = 6.97$, $\gamma_{w \rightarrow z} = 0.14$) (D) Result with loss of upregulation of LDH by HIF. ($\gamma_{O_2 \rightarrow u} = 10.0$, $\gamma_{u \rightarrow v} = 3.0$, $\gamma_{u \rightarrow w} = 6.97$, $\gamma_{w \rightarrow z} = 0.14$)

246 H^+ production rate in normoxia, while a decrease prevents a high H^+ production rate in hypoxia (results
247 not shown).

248 Interfering with PDK sensitivity to HIF or PDH sensitivity to PDK seems to have no effect on acid
249 production in the model but on oxygen consumption by the cell (results not shown).

250 Exploration of environment and genetic properties on the emergence of the Warburg phe- 251 notype

252 *Influence of environmental oxygen conditions*

253 The Warburg effect is currently defined as high production of acidity due to the use of glycolysis even in
254 normoxia [25, 26, 9]. We ran several simulations with different environmental oxygen conditions to assess
255 whether microenvironmental conditions only, can induce a Warburg effect in the model.

256 Figure 4 shows how oxygen conditions affect tumour growth. In oscillating conditions, the oxygen
257 concentration varies between physiological normoxia and pathological hypoxia and reverse every 6 hours
258 until the end of the simulation. Kinetics of HIF show a peak after 6h and a decrease to an equilibrium
259 state after 24h-48h. We choose to simulate 6h-period of hypoxia/normoxia to avoid the cell reaching an
260 equilibrium and to simulate stressful conditions with a high response to a low level of oxygen. Constant
261 hypoxia slows down tumour growth and reduces tumour diameter compared to normoxia. In all 3 dif-
262 ferent conditions, the centre of the tumour is composed of dead cells surrounded by living cells at the

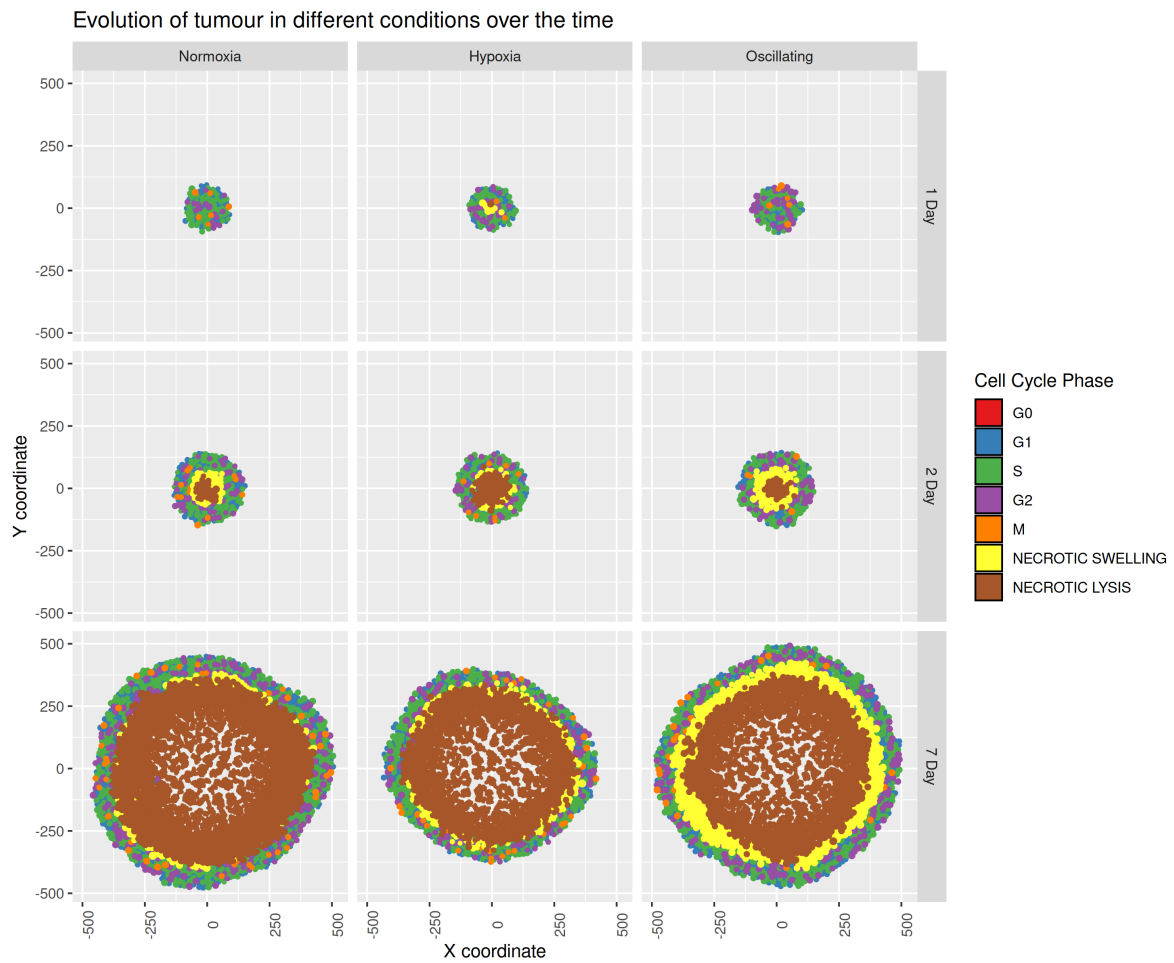


Figure 4: Evolution of tumour growth at different times in different conditions. In oscillating conditions, the oxygen concentration is slowly decreased from normoxia to hypoxia during 6 hours, then cells are slowly put back in normoxia at the same rate. This process is repeated until the end of the simulation.

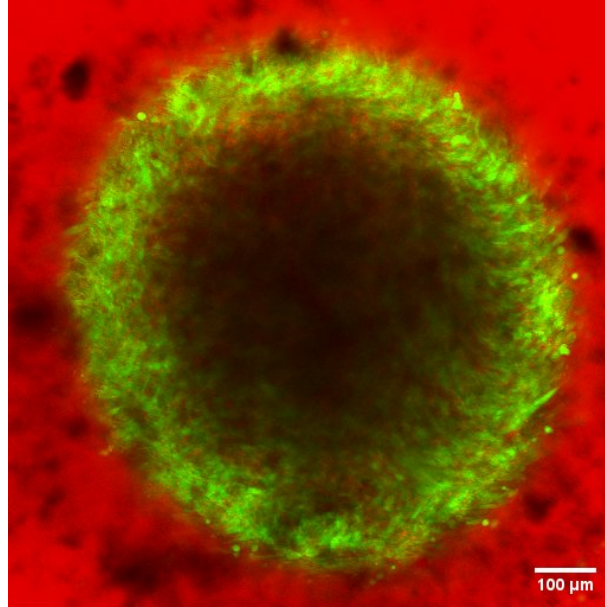


Figure 5: Picture of a spheroid grown for 30 days in an experiment run in the laboratory. Cells were marked using the fluorescent proteins Green FLuorescent Protein (GFP) and Sulforhodamine B (SRB). Living cells are colored in green, dying cells appear in red. The centre of the tumour is composed of hypoxic and dead cells, both do not emit fluorescence.

263 periphery. Only in normoxia and varying oxygen conditions, some cells in the centre of the tumour do
264 continue to divide (only visible after 7 days of growth). This may be due to the changes in the tumour
265 microenvironment with the increased cell death at the centre. As the cells die, more nutrients will be
266 available to quiescent cells to enable them to reenter proliferating phase. Moreover, spatial changes due
267 to the shrinkage of dead cells can influence the availability of nutrients at the centre. This might show a
268 mechanism by which the tumour can grow back after a period of harsh conditions, for example quiescence
269 can be a mechanism to avoid drugs effect for the tumour cell [30]. Necrotic core has been observed in
270 biological experiments run in the lab (figure 5).

271 It seems that varying the concentration of oxygen from normoxia to hypoxia, and reversing this
272 process, every 6 hours does not affect the diameter of the tumour at the end of the simulation. However,
273 a ring of necrotic cells in the swelling phase appears thicker than in other conditions.

274 Results in figure 6 show acid production according to the extracellular oxygen concentration. Red
275 line y-axis intercept is equal to 0.02085 mmol/L (2% O₂), which corresponds to the threshold of hypoxia
276 in physiological conditions. It is the level at which HIF has a half-maximal response as well [10]. Cells
277 above this level are considered to be in normoxia while the rest of the cells are in hypoxia. Levels of
278 extracellular oxygen fall below the hypoxia threshold after 2 days of growth in normoxic conditions (a
279 necrotic core in the centre of the tumour has already formed). Due to poor oxygen concentration, cells
280 with higher glycolytic activity appear and reach a H⁺ production rate of almost 5×10^{-4} mmol/L/min.
281 The maximum glycolytic activity of cells falls at 7 days of growth because of reduced glucose availability.
282 When tumour growth is started in hypoxic conditions, high glycolytic activity is present after only one
283 day of growth. In those conditions, the way the cell produces its energy is influenced only by glucose

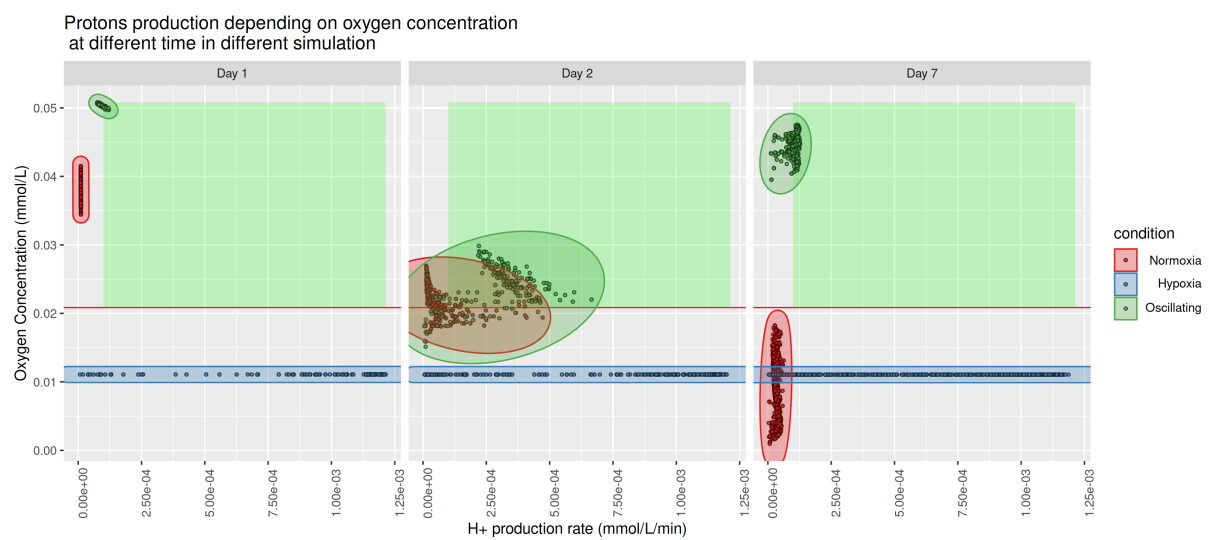


Figure 6: Acid production rate following oxygen extracellular concentrations at different times in different conditions. The red line indicates the hypoxia threshold. In oscillating conditions, oxygen concentration is slowly decreased from normoxia to hypoxia during 6h, then oxygen is increased to normoxia at the same rate. This process is repeated until the end of the simulation. Only living cells are represented on the graph. The green rectangle represents the region corresponding to a Warburg effect.

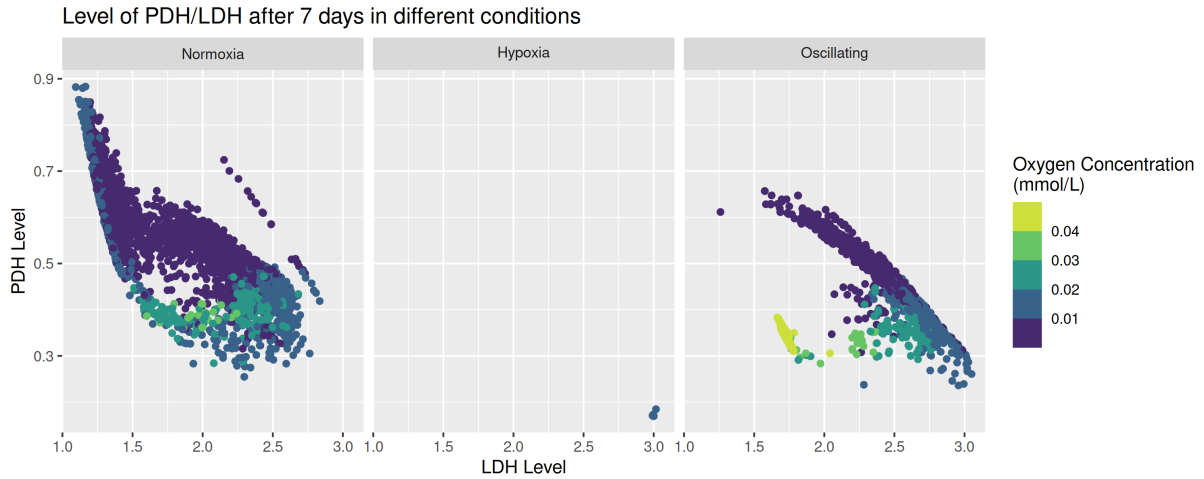


Figure 7: Plot of level of PDH against the level of LDH coloured by the extracellular oxygen concentration. The graph shows the results after 7 days of growth for different conditions. In oscillating conditions, oxygen concentration is slowly decreased from normoxia to hypoxia during 6h, then oxygen is increased to normoxia at the same rate. This process is repeated until the end of the simulation. Only living cell are represented on the graph.

284 concentrations (similar to the result shown in figure 3). Therefore, hypoxic conditions directly select cells
 285 with high glycolytic activity.

286 The fact that, in the model, hypoxia may select cells with high glycolytic activity is supported by the
 287 levels of LDH/PDH genes presented in figure 7. In normoxia, cells have a level of LDH and PDH of 1 for
 288 both, it can be associated to an oxidative state. In hypoxia, LDH level reaches 3.0 and PDH level falls to
 289 0.25, it can be associated to a glycolytic state. At the beginning of the simulation in normoxic conditions,
 290 cells have 1:1 LDH/PDH levels. As the simulation goes, oxygen becomes less available. Thus LDH level
 291 increases while PDH level decreases. The result in normoxic conditions shows that cells migrate from an
 292 oxidative to a glycolytic state as oxygen concentration decreases. Cells around 2:0.5 LDH/PDH levels
 293 have a hybrid state where they rely on both nutrients to produce ATP. Again hypoxia selects for cells
 294 with high levels of LDH and low levels of PDH, suppressing the possibility for the cell to adopt a hybrid
 295 state.

296 Interestingly, extracellular oxygen concentration after 7 days is higher when oxygen varies between
 297 normoxia and hypoxia every 6 hours than in constant normoxia. Since cells are put in hypoxia several
 298 times a day, they rely more on glycolysis and consume less oxygen. Cells with higher glycolytic activity
 299 (2.5×10^{-4} mmol/L/min) even above the threshold of hypoxia appear at 2 days. It suggests that the
 300 Warburg Effect can be caused by environmental conditions with rapid variations. Combined with figure
 301 7, genetic levels seems to indicate that cells cannot enter a complete oxidative state and are trapped
 302 either in a hybrid or a glycolytic state.

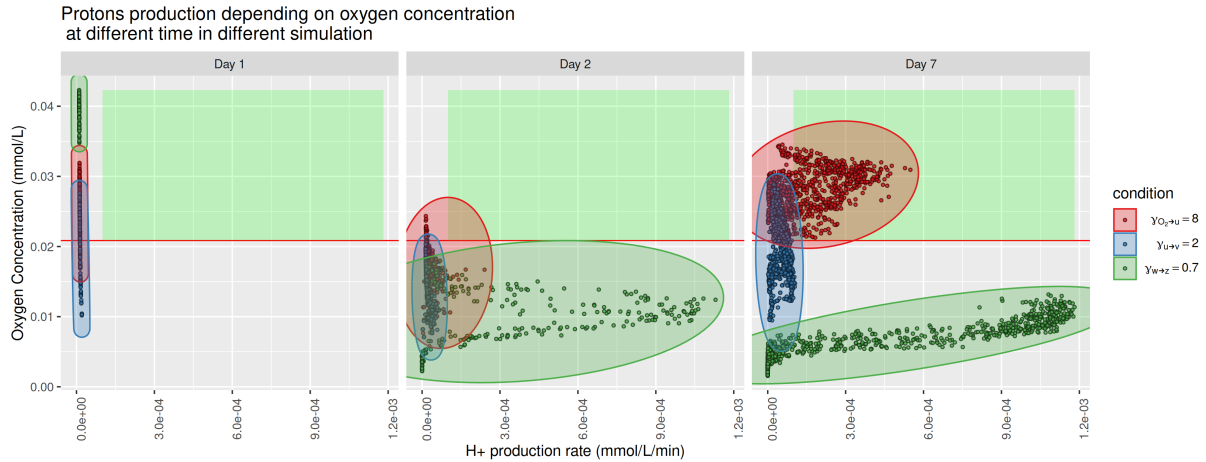


Figure 8: Acid production rate following oxygen extracellular concentrations at different times with different genetic perturbations. The red line indicates the hypoxia threshold. Only living cell are represented on the graph. Three genetics perturbations have been selected: reduced oxygen induced degradation of HIF ($\gamma_{O_2 \rightarrow HIF} = 8.0$), lower use of glycolysis in hypoxic conditions ($\gamma_{HIF \rightarrow LDH} = 2.0$) and lower effect of hypoxia on oxygen consumption ($\gamma_{PDK \rightarrow PDH} = 0.7$). Tumour growth was initiated in normoxia. The green rectangle represents the region corresponding to a Warburg effect.

303 *Influence of the intrinsic genetic properties of the cell*

304 Here, tumour growth is initiated in normoxia (results not shown). Extracellular oxygen concentrations
 305 only vary due to cells consumption and reduced diffusion in the tumour. Only genetics regulations have
 306 been modified between each simulation to assess the impact of different genetic deregulations (muta-
 307 tions or epigenetic alterations) on tumour growth and cell metabolism. Results are similar to normoxic
 308 conditions with no genetic deregulations (presented in figure 4). When reducing inhibition of PDH by
 309 PDK, tumour radius at 7 days of growth is lower than in normoxia and higher than in hypoxia with no
 310 mutation.

311 Figure 8 shows that cells start to become hypoxic after day 1, reaching a majority by day 2. After 7
 312 days with a reduced HIF degradation rate by oxygen, extracellular oxygen goes back to normoxic levels
 313 yet cells have a higher acid production rate that corresponds to a Warburg effect. In this case, we suppose
 314 that cells slowly drain oxygen levels in the environment to a point where hypoxia is reached. Due to
 315 poor oxygen conditions, cells adapt their metabolism to enter a glycolytic state that they keep even if the
 316 oxygen supply goes back above 2 %O₂. Together with the result in figure 9, this might be caused by a
 317 delay in the response from returning to normal conditions since HIF regulation by O₂ is affected. While
 318 some cells have levels of LDH greater than 2 and PDH lower than 0.50 (hybrid to glycolytic state), some

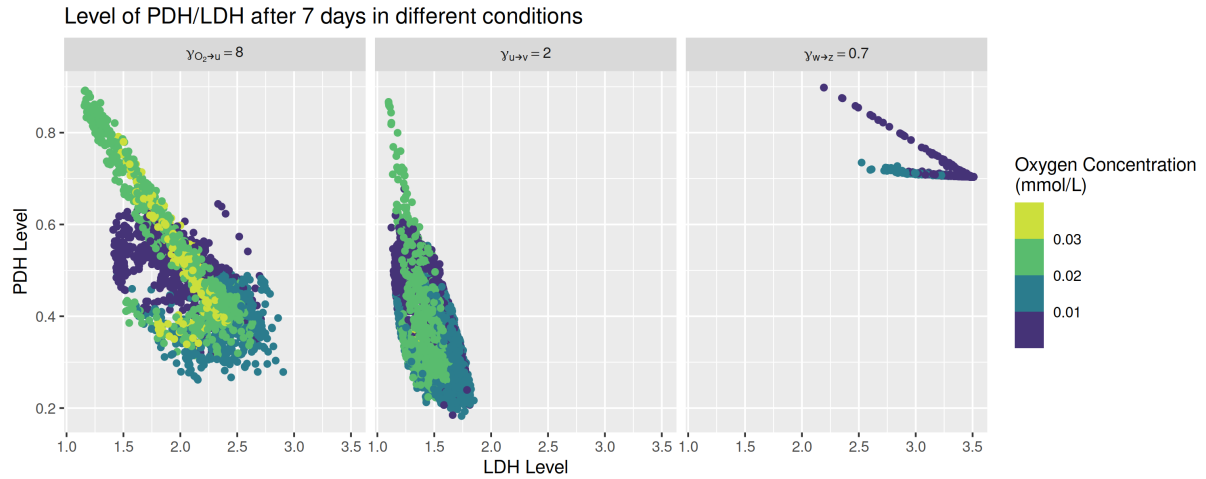


Figure 9: Plot of level of PDH against the level of LDH coloured by the extracellular oxygen concentration. The graph shows the results after 7 days of growth with three different genetic perturbations: reduced oxygen induced degradation of HIF ($\gamma_{O_2 \rightarrow HIF} = 8.0$), lower use of glycolysis in hypoxic conditions ($\gamma_{HIF \rightarrow LDH} = 2.0$) and lower effect of hypoxia on oxygen consumption ($\gamma_{PDK \rightarrow PDH} = 0.7$). Tumour growth was initiated in normoxia.

319 have a ratio of LDH/PDH almost equal to 1:1. This suggests that the Warburg Effect is not irreversible
 320 with a reduced HIF degradation rate by oxygen alone.

321 As expected, reducing the increase in LDH levels due to HIF response does not induce a high acid-
 322 ification rate in normoxia but affects the maximum acid production rate and level of LDH. Instead of
 323 inducing a glycolytic phenotype, it seems to repress it.

324 Reducing the inhibiting power of PDK on PDH allows the cell to keep a higher PDH level, a key
 325 enzyme for oxygen consumption and oxidative state in the model. Cells exhibit an acid production rate
 326 similar to those in hypoxic conditions after 2 and 7 days, compared to other genetics deregulation. While
 327 in normoxia with no genetic deregulation cells seem to fluctuate around the threshold of hypoxia, here
 328 they are all below this level. Since PDH is not effectively regulated by HIF, the cell tends to stay in an
 329 oxidative state and rely less on glycolysis. We can suppose that cells consume oxygen even when the level
 330 fall, creating further harder conditions. Results also show that adaptation to hypoxia is delayed and the
 331 cell only adopts a glycolytic state at oxygen conditions near-pathological hypoxia. PDH levels do not fall
 332 far below 0.75 even after 7 days of growth compared to others conditions, indicating that cells can only
 333 adopt an oxidative or hybrid state.

334 Discussion

335 In this paper, we formulated a mathematical model to study the impact of HIF on LDH and PDH,
 336 key enzymes of glycolysis and TCA cycle and thus investigating its role in cellular metabolism. Since
 337 its discovery, HIF has been actively studied by the scientific community. There are several modelling
 338 approaches to study the effects of HIF [27, 20, 18, 25] and here, we investigate its role using a multi-agent

339 model, considering a heterogeneous environment that changes over time. Furthermore, the model is used
340 to investigate the impact of genes on metabolism and the effect of different environmental conditions and
341 different genetic deregulations (such as mutations or epigenetic alterations) can have on the Warburg
342 Effect, an overproduction of acidity due to and increased glycolysis even in normoxia. Over-production
343 of lactate can also be caused by reduced use of pyruvate in the mitochondria, remaining pyruvate is then
344 turned into lactate.

345 Using the level of LDH and PDH genes as markers, we can define three different metabolic states like
346 [20, 25]: oxidative, glycolytic and hybrid. The oxidative state corresponds to a high level of PDH and
347 a low level of LDH, and inversely in a glycolytic state. The hybrid state then corresponds to medium
348 levels of both enzymes, 2:0.5 for LDH and PDH respectively. As expected, normoxia strongly selects for
349 the first state while hypoxia selects for the second one. The hybrid state is observed as the oxygen levels
350 change over time due to tumour growth. Thus it appears that the cell adopts this state when adapting
351 to changing oxygen conditions or when oxygen levels vary between normoxia and hypoxia several times
352 during tumour growth (oscillating conditions in the model).

353 We observed some differences between our model and the model in a recent paper from Li *et al* [20]: (1)
354 they identified a normal state with a level of LDH at 1 and a level of PDH at 0.1, (2) their oxidative
355 and glycolytic states have different levels of genes than those present in our model. This difference in the
356 result can be explained by the fact that we only include a small fraction of their gene regulation network
357 in our model, to only account for the effect caused by HIF.

358 We have simulated tumour growth when oxygen supply does not vary over time, hence differences in
359 extracellular oxygen level can only be caused by cell consumption or reduced diffusion owing to higher
360 cell density. We found that when there are rapid changes in oxygen supply to the tumour, cells with
361 higher glycolytic rates above the threshold of hypoxia appear. It shows that varying microenvironmental
362 conditions are sufficient to induce a Warburg phenotype for the cell. The results are inline with the
363 findings by Damaghi *et al* [9]. However, the model does not include sudden genetic mutation which
364 can be caused by harsh conditions. Therefore, in our case cell would not be trapped into a Warburg
365 phenotype and this state can be reversed to a normal state if the cell is given enough time in favourable
366 conditions. Lactate secretion, which decreases the extracellular pH, depends on glucose consumption. A
367 study from Casciari *et al* [31] has shown that a lower extracellular pH decreases dramatically glucose
368 consumption, the Warburg effect could also be inhibited by low pH (6.95). We may suppose that after
369 difficult conditions genes may be over-expressed or inhibited which will force the cell to adopt a Warburg
370 phenotype.

371 The importance of HIF degradation in normoxia is further highlighted by the model results. We
372 were also able to induce a Warburg effect by reducing the degradation rate of HIF by oxygen-dependent
373 enzymes. Our results show that this effect only appears after a first period of hypoxia. It suggests that
374 HIF accumulation forces the cell to adopt a glycolytic state and prevent it from returning to an oxidative
375 state in normoxia. HIF inhibition therapy would prevent the appearance of Warburg cell type in cancer.
376 PI3K and mTOR, two genes that increase HIF level independently of the level of oxygen [11, 14, 13], are
377 studied as potential targets in anti-cancer therapy due to their altered expression in cancer and their role

378 in signalling pathways affecting many biological functions [32, 33], possibly causing HIF overexpression.
379 AMPK enzyme is known to interact with HIF [25] and inhibits its expression, some evidence link this
380 gene to anti-tumour activity [34]. Those interactions could be added in further modelling work to study
381 their impact on the Warburg effect as they may be important players interacting with HIF.

382 It has been shown that extracellular pH can (1) influence the cell metabolism (reduce glucose con-
383 sumption, increase the cells doubling time) [31], (2) affect the ability of tumour cells to form metastasis,
384 invade other tissue or migrate [35] and (3) could be a mechanism of invasion [36]. Currently, therapy
385 targeting extracellular pH in the tumour are under development. Moreover, pH also affects the efficiency
386 of different drugs such as temozolomide [37]. Reducing the increase in LDH level by the cell response
387 to hypoxia lowered the rate of acid production in our simulation. Inhibitor of LDH could be used in
388 combination with pH targeting therapy to improve treatment outcomes.

389 Reducing the down-regulation of PDH by HIF in the model forces the cell to rely as much as possible
390 on oxygen to produce its energy. Herein, changes in metabolism toward glycolytic activity requires lower
391 levels of oxygen. A study has shown that inhibition of HIF resulted in reduced lactate production, increase
392 in oxygen consumption and radiotherapy sensitivity [7]. Whether increasing oxygen consumption by PDH
393 upregulation would result in better outcomes in therapy in the model remains to be studied.

394 Conclusion

395 The main interest of the model is its ability to qualitatively describe HIF expression in tumour devel-
396 opment over time with oxygen diffusion that depends on both cell consumption and cell density in the
397 tumour to obtain a more realistic diffusion. Results of the model show that varying oxygen levels and
398 reduced HIF degradation can cause increased glycolytic activity in normal oxygen levels. In the model,
399 the emergence of the Warburg effect is preceded by a first period of hypoxia before returning to normoxic
400 concentrations. This suggests that adaptation to environmental conditions is the primary phenomenon
401 to understanding the Warburg effect. Interfering with the genetic activity of HIF or its effect on LDH
402 and PDH may be used in therapy to induce specific behaviour in the cell.

403 Acknowledgements

404 We thank Alaa Tafech for providing the picture of the spheroid in Figure 5. This project has received
405 financial support from CNRS through the MITI interdisciplinary programs.

406 Kévin SPINICCI gratefully acknowledges the support of Swansea University Strategic partnership Re-
407 search Scholarship and the support of IDEX Université Grenoble Alpes.

408 Conflicts of Interest

409 The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] R. A. Bender. “Glycolysis”. In: *Brenner’s Encyclopedia of Genetics: Second Edition 2* (2013), pp. 346–349. DOI: [10.1016/B978-0-12-374984-0.00659-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00659-8).
- [2] Thomas C. King. “Cell Injury, Cellular Responses to Injury, and Cell Death”. In: *Elsevier’s Integrated Pathology* (2007), pp. 1–20. DOI: [10.1016/b978-0-323-04328-1.50007-3](https://doi.org/10.1016/b978-0-323-04328-1.50007-3).
- [3] F K Zimmermann. “Glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*”. In: *Encyclopedia of Genetics* (2001), pp. 885–888. DOI: [10.1006/rwgn.2001.0570](https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.0570).
- [4] Blanco, Antonio and Gustavo Blanco. “Medical Biochemistry”. Academic Press, 2018. In: (2017), pp. 283–323. DOI: [10.1016/B978-0-12-803550-4/00014-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4/00014-8).
- [5] Otto Warburg, Franz Wind, and Erwin Negelein. “The metabolism of tumors in the body”. In: *Journal of General Physiology* 8.6 (1927), pp. 519–530. ISSN: 15407748. DOI: [10.1085/jgp.8.6.519](https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2140820/>.
- [6] Pierre Jacquet and Angélique Stéphanou. “Metabolic Reprogramming, Questioning, and Implications for Cancer”. In: *Biology 2021, Vol. 10, Page 129* 10.2 (Feb. 2021), p. 129. ISSN: 20797737. DOI: [10.3390/BIOLOGY10020129](https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10020129). URL: <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/2/129/html>
<https://www.mdpi.com/2079-7737/10/2/129>.
- [7] Eric Leung et al. “Metabolic targeting of HIF-dependent glycolysis reduces lactate, increases oxygen consumption and enhances response to high-dose single-fraction radiotherapy in hypoxic solid tumors”. In: *BMC Cancer* 17.1 (Dec. 2017), p. 418. ISSN: 1471-2407. DOI: [10.1186/s12885-017-3402-6](https://doi.org/10.1186/s12885-017-3402-6). URL: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3402-6>.
- [8] Ian F. Robey et al. “Hypoxia-inducible factor-1 α and the glycolytic phenotype in tumors”. In: *Neoplasia* 7.4 (2005), pp. 324–330. ISSN: 15228002. DOI: [10.1593/neo.04430](https://doi.org/10.1593/neo.04430). URL: [/pmc/articles/PMC1501147/?report=abstract](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1501147/?report=abstract)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1501147/>.
- [9] Mehdi Damaghi et al. “The Harsh Microenvironment in Early Breast Cancer Selects for a Warburg Phenotype”. In: *bioRxiv* (Apr. 2020), p. 2020.04.07.029975. DOI: [10.1101/2020.04.07.029975](https://doi.org/10.1101/2020.04.07.029975). URL: <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.029975>.
- [10] S. R. McKeown. *Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours - Implications for treatment response*. Mar. 2014. DOI: [10.1259/bjr.20130676](https://doi.org/10.1259/bjr.20130676). URL: [/pmc/articles/PMC4064601/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4064601/)
[/pmc/articles/PMC4064601/?report=abstract](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4064601/?report=abstract)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4064601/>.
- [11] Georgina N. Masoud and Wei Li. “HIF-1 α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy”. In: *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5.5 (2015). ISSN: 22113843. DOI: [10.1016/j.apsb.2015.05.007](https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383515000817?pes=vor>.

- 445 [12] J. Xu et al. “Epigenetic regulation of HIF-1 α in renal cancer cells involves HIF-1 α /2 α binding to a
446 reverse hypoxia-response element”. In: *Oncogene* 31.8 (2012). ISSN: 09509232. DOI: [10.1038/ncr.](https://doi.org/10.1038/ncr.2011.305)
447 [2011.305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21841824/). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21841824/>
448 <https://www.nature.com/articles/ncr2011305>.
- 449 [13] Ji-Won Lee et al. “Hypoxia-inducible factor (HIF -1)alpha : its protein stability and biological
450 function s”. In: *Experimental and Molecular Medicine* 36.1 (2004), pp. 1–12. DOI: [10.1038/emmm.](https://doi.org/10.1038/emmm.2004.1)
451 [2004.1](https://www.nature.com/articles/emmm20041). URL: <https://www.nature.com/articles/emmm20041>.
- 452 [14] Yoshihiro Hayashi et al. “Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-
453 1 α in cancer”. In: *Cancer Science* 110.5 (May 2019), pp. 1510–1517. ISSN: 1347-9032. DOI: [10.1111/](https://doi.org/10.1111/cas.13990)
454 [cas.13990](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cas.13990). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cas.13990>.
- 455 [15] Roger McLendon et al. “Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes
456 and core pathways”. In: *Nature* 455.7216 (2008), pp. 1061–1068. ISSN: 00280836. DOI: [10.1038/](https://doi.org/10.1038/nature07385)
457 [nature07385](https://www.nature.com/articles/nature07385). URL: <https://www.nature.com/articles/nature07385>.
- 458 [16] Lucija Slemc and Tanja Kunej. “Transcription factor HIF1A: downstream targets, associated path-
459 ways, polymorphic hypoxia response element (HRE) sites, and initiative for standardization of
460 reporting in scientific literature”. In: *Tumor Biology* 37.11 (2016). ISSN: 14230380. DOI: [10.1007/](https://doi.org/10.1007/s13277-016-5331-4)
461 [s13277-016-5331-4](https://link.springer.com/article/10.1007/s13277-016-5331-4). URL: [https://link.springer.com/article/10.1007/s13277-016-5331-](https://link.springer.com/article/10.1007/s13277-016-5331-4)
462 [4](https://link.springer.com/article/10.1007/s13277-016-5331-4).
- 463 [17] Nobuhito Goda, Sara J. Dozier, and Randall S. Johnson. *HIF-1 in cell cycle regulation, apoptosis,*
464 *and tumor progression*. July 2003. DOI: [10.1089/152308603768295212](https://doi.org/10.1089/152308603768295212). URL: [https://www.](https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/152308603768295212)
465 [liebertpub.com/doi/abs/10.1089/152308603768295212](https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/152308603768295212).
- 466 [18] B. Bedessem and A. Stéphanou. “A mathematical model of HiF-1 α -mediated response to hypoxia
467 on the G1/S transition”. In: *Mathematical Biosciences* 248.1 (2014), pp. 31–39. ISSN: 00255564.
468 DOI: [10.1016/j.mbs.2013.11.007](https://doi.org/10.1016/j.mbs.2013.11.007). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mbs.2013.11.007>.
- 469 [19] Jerry J. Zimmerman, Amélie von Saint André-von Arnim, and Jerry McLaughlin. *Cellular Respi-*
470 *ration*. Fourth Edi. Elsevier, 2011, pp. 1058–1072. ISBN: 9780323073073. DOI: [10.1016/B978-0-](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07307-3.10074-6)
471 [323-07307-3.10074-6](http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-07307-3.10074-6). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-07307-3.10074-6>.
- 472 [20] Wenbo Li and Jin Wang. “Uncovering the Underlying Mechanisms of Cancer Metabolism through
473 the Landscapes and Probability Flux Quantifications”. In: *iScience* 23.4 (Apr. 2020), p. 101002.
474 ISSN: 25890042. DOI: [10.1016/j.isci.2020.101002](https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101002). URL: [https://doi.org/10.1016/j.isci.](https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101002)
475 [2020.101002](https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101002).
- 476 [21] Alvaro Marin-Hernandez et al. “HIF-1alpha Modulates Energy Metabolism in Cancer Cells by
477 Inducing Over-Expression of Specific Glycolytic Isoforms”. In: *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*
478 9.9 (Aug. 2009), pp. 1084–1101. ISSN: 13895575. DOI: [10.2174/138955709788922610](https://doi.org/10.2174/138955709788922610). URL: [http:](http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=9&issue=9&spage=1084)
479 [//www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=9&](http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=9&issue=9&spage=1084)
480 [issue=9&spage=1084](http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=9&issue=9&spage=1084).

- 481 [22] C. Granchi et al. “Inhibitors of Lactate Dehydrogenase Isoforms and their Therapeutic Poten-
482 tials”. In: *Current Medicinal Chemistry* 17.7 (2010), pp. 672–697. ISSN: 09298673. DOI: [10.2174/
483 092986710790416263](https://doi.org/10.2174/092986710790416263). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20088761/>.
- 484 [23] Shabnam Heydarzadeh et al. *Regulators of glucose uptake in thyroid cancer cell lines*. June 2020.
485 DOI: [10.1186/s12964-020-00586-x](https://doi.org/10.1186/s12964-020-00586-x). URL: <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00586-x>.
- 486 [24] Kieran Smallbone et al. “Metabolic changes during carcinogenesis: potential impact on invasive-
487 ness”. In: *Journal of theoretical biology* 244.4 (Feb. 2007), pp. 703–713. ISSN: 0022-5193. DOI:
488 [10.1016/J.JTBI.2006.09.010](https://doi.org/10.1016/J.JTBI.2006.09.010). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17055536/>.
- 489 [25] Dongya Jia et al. “Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic
490 pathways”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*
491 116.9 (Feb. 2019), pp. 3909–3918. ISSN: 10916490. DOI: [10.1073/pnas.1816391116](https://doi.org/10.1073/pnas.1816391116). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30733294/>.
- 493 [26] Rupert Courtney et al. “Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K”.
494 In: *Molecular biology reports* 42.4 (2015), pp. 841–851. ISSN: 15734978. DOI: [10.1007/s11033-015-
495 3858-x](https://doi.org/10.1007/s11033-015-3858-x).
- 496 [27] Mark Robertson-Tessi et al. “Impact of Metabolic Heterogeneity on Tumor Growth, Invasion, and
497 Treatment Outcomes”. In: *Cancer Research* 75.8 (Apr. 2015), pp. 1567–1579. ISSN: 0008-5472. DOI:
498 [10.1158/0008-5472.CAN-14-1428](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1428). URL: [http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/
499 10.1158/0008-5472.CAN-14-1428](http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-14-1428).
- 500 [28] Ahmadreza Ghaffarizadeh et al. “PhysiCell: An open source physics-based cell simulator for 3-D
501 multicellular systems”. In: *PLOS Computational Biology* 14.2 (Feb. 2018), e1005991. ISSN: 1553-
502 7358. DOI: [10.1371/JOURNAL.PCBI.1005991](https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1005991). URL: [https://journals.plos.org/ploscompbiol/
503 article?id=10.1371/journal.pcbi.1005991](https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1005991).
- 504 [29] Geoffrey M Cooper. “The Eukaryotic Cell Cycle”. In: (2000). URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.
505 gov/books/NBK9876/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/).
- 506 [30] Tomás Alarcón and Henrik Jeldtoft Jensen. “Quiescence: A mechanism for escaping the effects of
507 drug on cell populations”. In: *Journal of the Royal Society Interface* 8.54 (2011), pp. 99–106. ISSN:
508 17425662. DOI: [10.1098/rsif.2010.0130](https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0130). arXiv: [1002.4579](https://arxiv.org/abs/1002.4579).
- 509 [31] Joseph J. Casciari, Stratis V. Sotirchos, and Robert M. Sutherland. “Variations in tumor cell growth
510 rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH”. In:
511 *Journal of Cellular Physiology* 151.2 (1992), pp. 386–394. ISSN: 10974652. DOI: [10.1002/jcp.
512 1041510220](https://doi.org/10.1002/jcp.1041510220).
- 513 [32] Jing Yang et al. *Targeting PI3K in cancer: Mechanisms and advances in clinical trials*. 2019. DOI:
514 [10.1186/s12943-019-0954-x](https://doi.org/10.1186/s12943-019-0954-x).
- 515 [33] Tian Tian, Xiaoyi Li, and Jinhua Zhang. *mTOR signaling in cancer and mtor inhibitors in solid
516 tumor targeting therapy*. 2019. DOI: [10.3390/ijms20030755](https://doi.org/10.3390/ijms20030755).

- 517 [34] Weidong Li et al. *Targeting AMPK for cancer prevention and treatment*. 2015. DOI: [10.18632/](https://doi.org/10.18632/oncotarget.3629)
518 [oncotarget.3629](https://doi.org/10.18632/oncotarget.3629).
- 519 [35] S. D. Webb, J. A. Sherratt, and R. G. Fish. “Mathematical Modelling of Tumor Acidity: Regulation
520 of Intracellular pH”. In: *Journal of Theoretical Biology* 196.2 (Jan. 1999), pp. 237–250. ISSN: 0022-
521 5193. DOI: [10.1006/JTBI.1998.0836](https://doi.org/10.1006/JTBI.1998.0836). URL: <https://doi.org/10.1006/jtbi.1998.0836>.
- 522 [36] Kieran Smallbone, Robert A. Gatenby, and Philip K. Maini. “Mathematical modelling of tumour
523 acidity”. In: *Journal of Theoretical Biology* 255.1 (2008), pp. 106–112. ISSN: 00225193. DOI: [10.](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.08.002)
524 [1016/j.jtbi.2008.08.002](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.08.002).
- 525 [37] Angélique Stéphanou and Annabelle Ballesta. “pH as a potential therapeutic target to improve
526 temozolomide antitumor efficacy : A mechanistic modeling study”. In: *Pharmacology Research and*
527 *Perspectives* 7.1 (Feb. 2019). ISSN: 20521707. DOI: [10.1002/PRP2.454](https://doi.org/10.1002/PRP2.454).

A.2 Article soumis

- *"A simplified model of cell metabolism to revisit the glycolysis-OXPHOS relationship in the deregulated tumor microenvironment"*

A simplified model of cell metabolism to revisit the glycolysis-OXPHOS relationship in the deregulated tumor microenvironment

Pierre Jacquet and Angélique Stéphanou

Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, TIMC, 38000 Grenoble, France

Abstract

Cancer cells metabolism focuses the interest of the cancer research community. Although this process is intensely studied experimentally, there are very few theoretical models that address this issue. One of the main reasons is the extraordinary complexity of the metabolism that involves numerous interdependent regulatory networks which makes the computational recreation of this complexity illusory. In this study we propose a simplified model of the metabolism which focuses on the interrelation of the three main energy metabolites which are oxygen, glucose and lactate in order to better understand the dynamics of the core system of the glycolysis-OXPHOS relationship. So simple as it is, the model highlights the main rules allowing the cell to dynamically adapt its metabolism to its changing environment. It also makes it possible to address this impact at the tissue scale. The simulations carried out in a spheroid show non-trivial spatial heterogeneity of energy metabolism. It further suggests that the metabolic features that are commonly attributed to cancer cells are not necessarily due to an intrinsic abnormality of the cells. They can emerge spontaneously due to the deregulated over-acidic environment.

Keywords: acidity, theoretical model, energetic needs, pyruvate-lactate, Warburg effect

1. Introduction

The energy metabolism of cancer cells has been the subject of extensive research for over fifty years, yet the mechanisms governing tumor metabolism are not clearly understood. The Warburg effect, which now appears to be accepted as a key feature of many types of cancer, is considered by some as one possible fundamental cause of cancer [1, 2]. Some define this effect as a high lactate production despite a sufficient oxygen supply [3, 1]. However according to Warburg's original observations in the 1920s, the effect is limited to the tumor producing a large amount of lactate (regardless of the presence of oxygen) [4, 5, 6]. This lactate production is induced by high glycolytic activity and increased glucose uptake. This creates around the cells, and in particular within solid tumors, a whole microenvironment, characterized by an acidic pH, favoring the invasion of tumor cells. A recurring question remains "how do these extreme conditions benefit the cell ?" [7, 8, 9]. Understanding the impact of the microenvironment on ATP production may be part of the answer.

The purpose of this paper is to address this issue with a simple mathematical model of cell metabolism limited to the glycolysis-OXPHOS relationship to highlight the consequences on this duo and provide a new understanding of cell energy metabolism.

Cell metabolism is highly complex because it is a multifactorial mechanisms that involves many different interacting processes with many different actors. Moreover it is an evolving process and although crucial, this aspect is rarely considered and often overlooked. In this context, a theoretical model is a powerful and efficient way to make sense of this complexity and to address temporality. It makes it possible to test the relevance of new hypotheses and to exhibit emergent properties that cannot be intuited, in order to better understand the intimate functioning of metabolic processes and also to provide new insights to guide future research.

Several models have been proposed to describe cell energy metabolism [10, 11, 12, 13, 14] but some may be too complex to be easily reused and tested by experimentation. We therefore focused more specifically on models describing the production of ATP as a function of the conditions surrounding the cell. Extracellular oxygen and glucose concentrations, lactate production and the quantification of extracellular pH (by protons secretion) are the conditions that were mainly taken into account in the modeling. The availability of glucose and oxygen influences the activity of glycolysis and oxydative phosphorylation (OXPHOS), respectively. Casciari *et al.*, (1992) [15, 16] proposed a model which describes changes in glucose and oxygen consumption in EMT6/Ro cells. They raised the importance of pH on these uptakes and mathematically formalized these observations. This pioneering model – which exploits experimental data – has since been used in several studies [11, 17, 18].

Our computational model is again primarily based on this reference model. However, it additionally integrates the most recent knowledge, in particular the disappearance of the Warburg phenotype under acidic conditions [19], and is rooted on new key observations and established facts. The model once again focuses on the glycolysis-OXPHOS relationship but emphasizes the role of lactate as a substrate. Lactate is indeed of particular interest because it can allow tumor cells to survive despite a significant depletion of glucose [20]. Its role for cell viability under acidic conditions has been overlooked since very few models integrate this important fact.

Our model also takes into account the central role of pyruvate in the regulation of the metabolism. It may seem trivial to recall that, glycolysis is the set of reactions that transform glucose into pyruvate, but sometimes glycolysis is mentioned as the complete transformation of glucose into lactate (also called fermentation). This is a source of misunderstanding, as it suggests that glycolysis opposes the mitochondrial metabolic pathway that would be an independent process. In fact the Krebs cycle and the OXPHOS which results from it, require pyruvate resulting from glycolysis under normal conditions, as a first step, hence its pivotal role. These paths, although running in parallel in the cell, are in reality a chain of reactions and not dual options which exclude one another.

The model then investigates how imposed environmental constraints and the imposed energy needs of the cell push the cell to adapt its metabolism to meet its needs. The simulations performed are insightful since they clearly show how glycolysis and OXPHOS are used concomitantly and cooperatively [21]. The gradation in their relative contributions to ATP production has been shown to depend on available resources and environmental acidity.

2. Materials and Methods

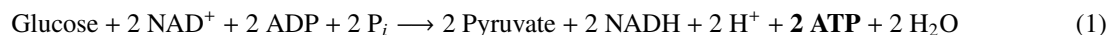
2.1. Modeling approach and model assumptions

Our modeling approach is oriented towards a global understanding of an idealized aspect of cell metabolism. Cell metabolism is highly complex and exhibits a wide diversity of responses among cells. All cells do not behave in the same way under the same environmental constraints. However, there are some fundamental principles that have yet to be elucidated. The aim of our model is to focus on the relationship between OXPHOS and glycolysis where we specifically look at the impact of acidity on this relationship and the role that pyruvate can play as a regulatory agent in the absence of other regulation. This implies using a simplified model which only retains the main players in this relationship, which means that the many other regulatory processes of the enormous metabolic machinery are not taken into account. The system we are studying is therefore only a subsystem of this global machinery, studied in isolation to exhibit its fundamental principles.

We focus on the glycolysis-OXPHOS system, as well as the place of lactate within it. It is nevertheless important to remember that other pathways such as β -oxidation of fatty acids or glutaminolysis can contribute to increasing the

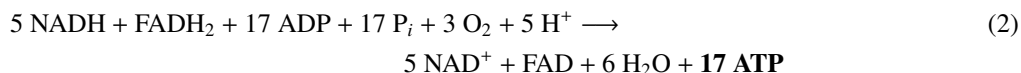
reaction intermediates and thus increase the energy production capacity.

In order to define our model, we first recall some fundamental concepts of the metabolism of these two pathways. Glucose is considered as the main source of energy for the cell. This molecule is catabolized during a sequence of three processes essential to produce ATP. The first reaction, glycolysis, transforms glucose into pyruvate as follows:



NAD^+ is rate limiting for glycolysis, in the reaction catalyzed by Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). But in the overall fermentation / respiration process, the NAD^+ pool is refilled by LDH, or oxydative phosphorylation. If the ratio $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ is too low, glycolysis will be inhibited. Numerous metabolic reactions modify this ratio and more generally the redox state of the cell. Here the goal is not to model all the mechanisms which can lead to changing the $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ ratio. We therefore consider that NAD^+ is not limiting for the processes we seek to observe.

Pyruvate can be reduced to lactate with lactate dehydrogenase (LDH) but the reaction will not produce more ATP. Pyruvate can also be decarboxylated by the pyruvate dehydrogenase in Acetyl-CoA. This decarboxylation takes place in the mitochondria. If the pyruvate is converted into lactate, the latter, under physiological conditions, will be secreted in the extracellular space by MCT transporters. Otherwise, the pyruvate is converted to Acetyl-CoA, which enters the citric acid cycle, generates one GTP (equivalent to one ATP) and generates NADH and FADH_2 used in the final step of the reaction. It is the OXPHOS, in which the energy released by the transfer of electrons from a donor to an acceptor (notably oxygen), which is used to produce a large amount of ATP (from ADP). This final reaction can be summarized as follows:



Each reaction is written in its canonical form. From one glucose molecule, the cell can obtain a total of 38 ATP molecules. Currently, the estimation of the number of ATP molecules produced during aerobic respiration is still under debate (38 is a theoretical maximum) [22, 23]. We will continue our calculation with 17 moles of ATP per mole of pyruvate [17]. It is also relevant to note that in several experiments the level of pyruvate remains relatively constant (regardless of the microenvironment) [19]. We therefore hypothesize that pyruvate functions as a reservoir that flows according to the mitochondrial energy needs. If this reservoir overflows (too much pyruvate produced), the excess is converted into lactate. Conversely, if it empties faster than it fills (not enough pyruvate), production or consumption can be readjusted (by reabsorbing lactate for example). We note that the PKM2 (Pyruvate Kinase) enzyme is limiting in the final reaction of pyruvate production. This enzyme is tightly regulated and this regulation determines whether glycolytic intermediates before pyruvate should be used in synthesis of amino-acid/nucleic acid or not. In a cancer scenario, the PKM2 enzyme is mainly in its inactive dimeric form but can switch to its trimeric form by the accumulation of Fructose 1,6-bisphosphate (FBP) which leads to the conversion of most glycolytic intermediates to pyruvate [24]. The tetramer/dimer ratio of PKM2 enzyme oscillates[25]. This mechanism is not studied here but could modify the temporal dynamic of glycolysis. However, the fact that a large amount of lactate is produced in cancer cells, indicates that over a longer period of time, the PKM2 enzyme still allows the reaction to take place. Pyruvate can also be produced from oxaloacetate by pyruvate carboxylase to remove excess oxaloacetate in the TCA cycle. Finally pyruvate is also used to produce alanine. These two mechanisms are not considered in this model.

The model is based on the following experimental observations:

1. Glucose consumption increases with glucose concentration, oxygen consumption increases with oxygen concentration [15, 26] and lactate consumption increases with lactic acidosis [19, 27], meaning that the substrates directly influence consumption rates.

2. The less oxygen there is in the extracellular medium, the more glucose consumption increases [28] up to a saturation threshold [15]. Indeed, if one pathway of ATP production slows down, the other takes over to guarantee steady-state ATP levels and this requires an increase in the corresponding uptakes.
3. The more acidic the medium (the protons concentration is high), the lower the glycolysis. Acidification of the medium slightly lowers the intracellular pH, and decreases the activity of glycolytic enzymes. This causes an increase in intracellular glucose, which at one point leads to a decrease in glucose uptake [15, 19, 29, 30].
4. The pyruvate concentration remains relatively constant [19]. The maintenance of this constant level is mainly enabled by several mechanisms: the regulation of its production by glycolysis, the regulation of its consumption in respiration, its excretion by lactate and its regeneration from lactate.

2.2. Model equations

To estimate the rate of ATP production per cell, it is necessary: (i) to evaluate the rates of cell consumption of glucose, oxygen and lactate which are the three limiting substrates for energy production and (ii) to understand how these different consumption rates vary depending on the environmental conditions. ATP production comes from two main processes and can therefore be represented in two parts. The first part, is the ATP produced by glycolysis and the second one, the ATP produced by OXPHOS, if there is enough pyruvate and oxygen in the medium. Assuming that changes in glucose and oxygen concentrations in cells depend primarily on their consumption and uptake rates, they write:

$$\frac{d[G]}{dt} = \overbrace{-k_1[G]}^{\text{Glucose consumption}} + \overbrace{U_G}^{\text{Glucose uptake}} \quad (3)$$

$$\frac{d[O]}{dt} = \overbrace{-3k_2[Pyrr][NADH][O]^3}^{\text{Oxygen consumption}} + \overbrace{U_O}^{\text{Oxygen uptake}} \quad (4)$$

And, according to reactions (1) and (2), the evolution of the ATP concentration is given by:

$$\frac{d[ATP]}{dt} = 2k_1[G] + 17k_2[Pyrr][NADH][O]^3 \quad (5)$$

where $[G]$, $[O]$, $[ATP]$, $[Pyrr]$ and $[NADH]$ are the intracellular concentrations of glucose, oxygen, ATP, pyruvate and NADH respectively. k_1 is the rate of glycolysis and k_2 is the oxygen consumption rate through the citric acid cycle and OXPHOS combined. Given the equilibrium condition where the uptake of glucose and oxygen are equal to their respective consumption, this equation can be rewritten as follows:

$$\frac{d[ATP]}{dt} = 2U_G + \frac{17}{3}U_O \quad (6)$$

It is then necessary to evaluate respectively the glucose and oxygen consumption rates U_G and U_O . Casciari *et al.*, (1992) [15] proposed a model, based on experiments on EMT6/Ro cells, where the uptake depend on the concentrations of the substrates and on the pH. This model has been used and modified several times to describe the growth of spheroids [17] or to estimate the amount of ATP produced [18, 11]. However, the model does not integrate the energetic role of lactate. Only the acidification of the medium is taken into account. According to *observation 3*, this implies a significant drop in glucose consumption which raises the problem of the stability of the ATP level since it cannot be maintained for long enough.

We built our model of cell metabolism considering that oxygen consumption does not directly depend on glucose concentration by contrast with other existing models [15, 17, 18, 13]. In our model (Fig 1), ATP is the factor that links oxygen to glucose: the more glucose is used to produce ATP, the less oxygen is consumed. This new hypothesis releases a strong constraint on the system and allows more flexibility with the potential to generate more metabolic behaviors. *In vivo*, OXPHOS is not directly limited by ATP (however the reduction of ADP pool reduces its activity). But TCA enzymes like isocitrate dehydrogenase or oxoglutarate dehydrogenase are inhibited by ATP and NADH. By limiting these steps there is less NADH produced that can be used later for OXPHOS. In addition, the less oxygen

there is, the more glucose consumption increases. Indeed, when the cell lacks oxygen, HIF is stabilized and upregulates the expression of glycolytic enzymes [31, 32, 33]. This improvement in the model makes things more natural (*i.e.* more emergent).

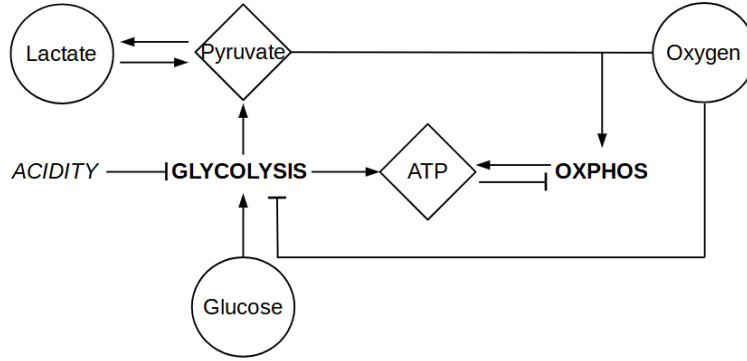


Figure 1. Overview of the model. Circular boxes represent the extracellular substrates, diamond boxes represent the intracellular proteins or molecules.

2.2.1. Glucose uptake rate, U_G

According to experimental *observation 1*, glucose uptake increases with the concentration of extracellular glucose up to a saturation threshold. The simplest way to represent this property is to use a Michaelis-Menten function:

$$U_G = V_G^{max} \times \frac{[G]}{k_G + [G]} \quad (7)$$

where k_G is the Michaelis constant for glucose consumption and V_G^{max} is the maximum uptake rate of glucose at saturation. First, the less oxygen there is, the more V_G^{max} increases (*observation 2*). In addition, the more acidic the medium, the more V_G^{max} decreases (*observation 3*). This is also true when the pH becomes alkaline [34]. V_G^{max} is therefore expressed by the combination of these two effects as follows:

$$V_G^{max} = U_G^{max} \times \left(\frac{p_G^O}{p_G^O + [O]} \right) \times \left(p_G^{pH_{max}} \times \exp \left(-\frac{(\text{pH} - \text{pH}_{max})^2}{2\sigma^2} \right) \right) \quad (8)$$

where U_G^{max} is the physiological uptake limit of glucose and p_G^O is a constant for glucose uptake variations as a function of oxygen level. The term related to the pH has a Gaussian form, which (i) varies from close to 0, when the pH is acidic, to 1 when it is physiological ($\text{pH} \approx 7.3$), (ii) reaches a maximum at pH_{max} , which is the pH corresponding to the maximum glucose uptake and (iii) then decreases. $p_G^{pH_{max}}$ is the maximum expression of glucose uptake when the pH is optimal and σ is a constant that tunes the spread in the Gaussian term of the glucose uptake.

2.2.2. Oxygen uptake rate, U_O

As for glucose and according to *observation 1*, oxygen uptake is described with a Michaelis-Menten function:

$$U_O = V_O^{max} \times \frac{[O]}{k_O + [O]} \quad (9)$$

where k_O is the Michaelis constant for oxygen consumption and V_O^{max} is the maximum uptake rate of oxygen at saturation.

Unlike glucose, the diffusion of oxygen across the plasma membrane is passive diffusion. Thus, it can be considered that the oxygen concentration at equilibrium, outside and inside the cell is almost identical. Only the oxygen consumption by the cell governs the inflow. The main role of OXPHOS is to supply the ATP needed by the cell and

the rate of ATP synthesis by OXPHOS is tightly coupled to the rate of ATP utilization [35]. Rather than varying the oxygen consumption according to the glucose concentration as in previous models [15, 17, 11], we hypothesize that it varies directly according to the need for ATP not filled by glycolysis. Indeed, there is no molecular proof allowing to directly link the evolutions of the two substrates. There are, in the other hand, a multitude of other signals which indirectly link the two. If the cell needs a specific ATP level (ATP_{target}), the mitochondria must produce the missing part of ATP ($ATP_{target} - ATP_{glycolysis}$) to complete the part produced by glycolysis ($ATP_{glycolysis}$).

From (eq.2) and (eq.6), to produce 1 mole of ATP, the mitochondria needs 3/17 mole of oxygen. For 3 moles of oxygen, one mole of pyruvate is consumed. Taking into account the fact that the pyruvate level can be limiting, V_O^{max} is expressed by the following expression:

$$V_O^{max} = \min\left(3 \times [Pyr], \quad p_O^{ATP} \times \frac{3}{17}(ATP_{target} - ATP_{glycolysis})\right) \quad (10)$$

with p_O^{ATP} , the rate of production for missing ATP.

2.2.3. Lactate uptake rate, U_L

Lactate can be produced and secreted as well as consumed. Again, as for glucose and oxygen, lactate uptake can be written with the following expression (*observation 1*):

$$U_L = V_L^{max} \times \frac{[L]}{k_L + [L]} \quad (11)$$

where $[L]$ is the lactate concentration and k_L is the Michaelis constant for lactate consumption. Xie *et al.*, (2014) [19], measured the amount of lactate consumed as a function of the level of lactic acidosis. They showed that in a low pH environment, the higher the extracellular lactate level, the more lactate uptake increases to the point where the inflow exceeds the outflow (*observation 4*). Lactate transport is mediated by monocarboxylate transporters (MCT), a group of plasma membrane transporters bound to protons. A proton gradient between the outside and the inside of the cell is necessary to transport the lactate [36]. The parameter V_L^{max} is therefore taken as a Hill function which decreases with increasing pH.

$$V_L^{max} = U_L^{max} \times \left(1 - \frac{pH^n}{(k_{pH})^n + pH^n}\right) \quad (12)$$

2.2.4. Pyruvate fate and Lactate secretion

The change in intracellular pyruvate concentration is written as:

$$\frac{d[Pyruvate]}{dt} = \underbrace{\left(2U_G\right)}_{\text{GLYCOLYSIS}} - \underbrace{\left(\frac{1}{3}U_O\right)}_{\text{OXPHOS}} + \underbrace{U_L}_{\text{Pyr} \leftarrow \text{Lac}} - \underbrace{S_L}_{\text{Lac} \leftarrow \text{Pyr}} \quad (13)$$

Xie *et al.*, (2014) [19] observed that the level of pyruvate remains constant regardless of the pH and lactate conditions (*observation 4*). In this case, the preceding formula can be written:

$$2U_G + U_L = \frac{U_O}{3} + S_L \quad (14)$$

Finally, pyruvate converted to lactate corresponds to the "excess" pyruvate, $[Pyruvate]_{target}$ being the basal concentration in the cell. Since this is a surplus, this term should not be negative:

$$S_L = \min\left(0, \quad p_{Lac}^{Pyr} \times ([Pyruvate]_{target} - [Pyruvate])\right) \quad (15)$$

with p_{Lac}^{Pyr} , the rate of production for missing Pyruvate.

The functions defined in (eq.7-12) are adjusted and parameterized from experimental data. Table 1 summarizes the values used in the model and their sources.

Table 1. Parameter values used to perform the simulations

Symbol	Value	Description	References
$[G]$	[0, 15] mM	Extracellular concentration of glucose	[15]
$[O]$	[0, 0.1] mM	Extracellular concentration of oxygen	[15]
$[L]$	0 mM	Extracellular concentration of lactate	[19]
$[Pyr]$	0.12 mM	Intracellular concentration of pyruvate	[19]
ATP_{target}	2.8 mM	Intracellular concentration of ATP	[3]
U_G^{max}	1×10^{-7} mol/cell/s	Physiological uptake limit of glucose.	Estimated ¹
U_L^{max}	1×10^{-6} mol/cell/s	Physiological uptake limit of lactate.	Estimated
k_G	0.04 mM	Michaelis-Menten constant for glucose consumption	[15]
k_O	4.6×10^{-3} mM	Michaelis-Menten constant for oxygen consumption	[15]
k_L	21.78 mM	Michaelis-Menten constant for reverse LDH reaction	[37]
k_{pH}	6.9	pH at which the uptake of lactate is at half its maximum capacity.	Fitted from [19]
P_G^O	0.24	Constant of glucose uptake variation according to oxygen level	Fitted from [15]
P_O^{ATP}	1/cell/s	Constant that defines the rate of adaptation to missing ATP	Estimated
P_{Lac}^{Pyr}	1/cell/s	Constant that defines the rate of adaptation to missing Pyruvate	Estimated
$P_G^{pH_{max}}$	1.3	Maximum expression of glucose uptake when the pH is optimal.	Fitted from [19, 34]
pH_{max}	7.5	pH at which glucose uptake is maximal.	Fitted from [19, 34]
σ	0.27	Constant for spread in gaussian term of the glucose uptake	Fitted from [19, 34]
n	67.95	Hill coefficient for uptake of lactate according to pH.	Fitted from [19]
ATP_{demand}	[0.1; 0.2495; 1] $\times 10^{-5}$ mol/cell/s	ATP needs for a cell from low to high removed from the pool at each time step	Estimated ²

2.3. Simulations

2.3.1. Individual cell level

To simulate the evolution of metabolic molecules, we used the *DifferentialEquations.jl* module (v 1.10.1)[38] from the Julia language (v 1.1.1). This module integrates many solvers of Ordinary Differential Equations (ODE) and we have chosen the solver *AutoTsit5-Rosenbrock23*, which allows to automatically choose the algorithm adapted to the stiffness of the problem (more details are available on the module documentation page): https://diffreq.sciml.ai/stable/solvers/ode_solve/.

The julia code is available in jupyter notebook format (.ipynb) at the following link:

https://github.com/pierrejacquet/ATP_metabolism_Julia

2.3.2. Cell population level

To produce the spheroid simulation, we have integrated our model of cell energy metabolism as a module in PhysiCell (v1.5.2 available at <http://physicell.org/>) [39], an open source physics-based cell simulator that manages, among other things, the diffusion of substrates in the culture medium and provides tools to define cell cycle, division rates, necrotic and apoptotic events. As an agent-based model, each cell is independent and has its own internal processes (cell cycle, energy metabolism). They interact with each other and share local resources. In our

¹This parameter is set high to accelerate the simulation (this does not change the conclusions of the simulation) the value usually observed is around: $[0.1-1] \times 10^{-16}$ mM.s⁻¹, see [17, 15].

²This parameter is also set high to match the high uptakes, the value usually observed is around: $[0.1-1] \times 10^{-15}$ mM.s⁻¹, see [17, 18]

model implementation, the diffusive resources are: oxygen, glucose, lactate and protons. We have integrated each phase of the cell cycle. The standard duration of the cell cycle is fixed at 24 hours (G1: 11h, S: 8h, G2: 4h, M: 1h) [40], in a medium with optimal oxygenation (fixed at $pO_2 = 38\text{mmHg}$, or 0.05282 mM). If oxygen is lacking, the duration of the G1 phase extends proportionally to the ratio: $pO_2/38$.

3. Results

3.1. Metabolic landscape depending on substrates availability

The model satisfies the experimental observations. To test the model the extracellular concentrations were taken between 0 and 0.1 mM for oxygen and between 0 and 5 mM for glucose. These values are compatible with *in vivo* concentrations. Consumption terms have been normalized to facilitate the comparison between conditions. As oxygen becomes scarce or the concentration of extracellular glucose increases, glucose uptake increases (Fig. 2A). Conversely, the presence of glucose lowers oxygen consumption (Fig. 2C). The effect of intracellular pH makes glucose consumption close to zero under acidic conditions (Fig. 2B). Consequently, oxygen uptake no longer depends on the presence or absence of glucose in the medium at acidic pH (Fig. 2D).

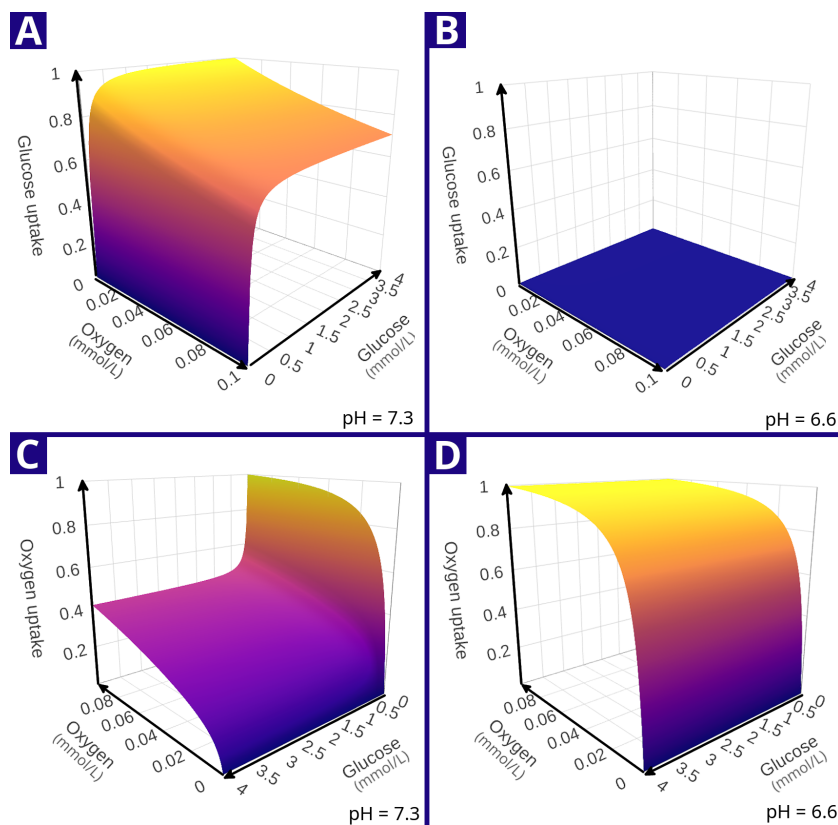


Figure 2. Normalized uptakes at different pH and extracellular concentrations of oxygen and glucose in *mM*. (A) Glucose uptake at pH 7.3. (B) Glucose uptake at pH 6.6. (C) Oxygen uptake at pH 7.3. (D) Oxygen uptake at pH 6.6.

From the previous uptakes, the ATP production rate can be calculated (see eq.6). Several models do not take into account the need for ATP as a mechanism for regulating the uptakes of the main substrates. However, it would be expensive for a cell to produce more ATP than it needs [41] (and regulatory mechanisms prevent this from happening), as well as it would be disadvantageous to under-produce ATP when surrounding resources are available. The result is that the cell cannot ensure a constant level of ATP as soon as the concentration of one of the extracellular substrates

is changed. The cell needs a specific level of ATP and adapts its energy mechanisms to meet this need. Here, it is OXPHOS that meets the ATP needs not met by glycolysis. Figure 3A shows that the cell - when the conditions are not extreme (glucose or oxygen concentrations not close to zero) - can plateau and stabilize its ATP production to respond to a fixed need. When the substrates are close to zero, ATP production decreases rapidly. Under acidic conditions (Fig. 3B), the cell loses its dependence on glucose. The production of ATP depends mainly on the concentration of oxygen (and of pyruvate not shown on this figure).

Figure 3C is a two-dimensional (2D) projection of figures 3A and 3B, with a logarithmic scale. This 2D representation is interesting for observing the levels of ATP production. Although it is not possible to reduce the cell state exclusively to its ability to maintain a certain level of ATP, it is clear that a proliferative cell uses more ATP than a quiescent cell [42]. It is then possible to associate different types of cells with different regions since the probability of encountering proliferative cells is greater in regions with high ATP production and necrotic cells in those with low ATP production.

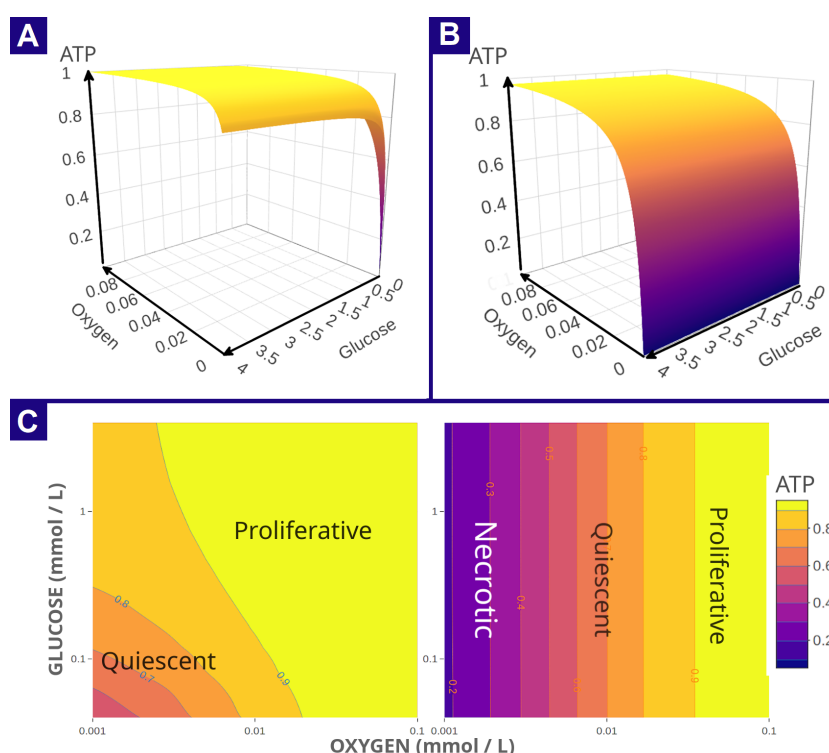


Figure 3. Normalized ATP production rate in multiple conditions. (A) ATP Production rate at pH 7.3. (B) ATP Production rate at pH 6.6. (C) Heatmap of ATP production rate at pH 7.3 (left) and 6.6 (right) with a logarithmic scale. For each ATP level a cellular state can be associated. Typically low levels of ATP correspond to quiescent cells (reduced metabolism) whereas high levels of ATP are associated to proliferating cells. The cell states are only mentioned here for illustrative purposes.

3.2. Adaptation dynamics of the cell metabolism

Cellular energy metabolism is often reduced to one observation at a given point in time, however it is a highly dynamic process. The cell constantly adapts to the changing environment and to its energy needs (mass production, division, *etc.*). It therefore makes sense to consider the temporal evolution of the system given the environmental context. Here we consider three typical situations corresponding to idealized cases in order to explore the model behavior:

1. a case where oxygen is non-limiting which is compatible with 2D cell cultures (*in vitro*);
2. a case where oxygen is limiting which is compatible with a poorly perfused environment;

3. a case where oxygen varies that mimics tumor angiogenesis.

For each of these three different environmental conditions, we consider three different levels of cell energy demand: low, medium and high.

Figure 4 presents the *non-limiting oxygen case*, where oxygen is maintained at a constant level throughout the simulation. Glucose is, on the other hand, consumed over time and decreases with an intensity linked to cellular energy demand. We note that for higher energy demands, glucose uptake saturates. Therefore, the drop in glucose concentration is the same for medium and high ATP demands (both are beyond the saturation level). For low energy demand, OXPHOS is low, because there is no need for more ATP. This low OXPHOS is insufficient to absorb all the pyruvate produced by glycolysis. As a result, the excess pyruvate is converted into lactate, which is excreted thus increasing the acidity. This drop in pH creates a negative feedback on glucose uptake until equilibrium is reached between glycolytic flux and OXPHOS. In other words the production of pyruvate (by glycolysis) and the consumption (by OXPHOS) become equal thus stabilizing the pH. This corresponds to a glycolytic contribution to ATP production of 5.5%.

When the demand for ATP is high, the glycolysis is not sufficient to produce the pyruvate which feeds the OXPHOS flux for which the oxygen uptake is high. As a consequence, pyruvate drops to extinction. Since the OXPHOS cannot be fueled, the high level of ATP cannot be maintained and drops too. We note that this situation depicts an extreme case proposed as an illustrative example, which is rarely observed *in vivo* because the cell tends to reduce its energy demand to avoid this situation. Moreover, there are numerous alternative energy substrates and pathways that the cell can use to produce its energy and that we have not considered here.

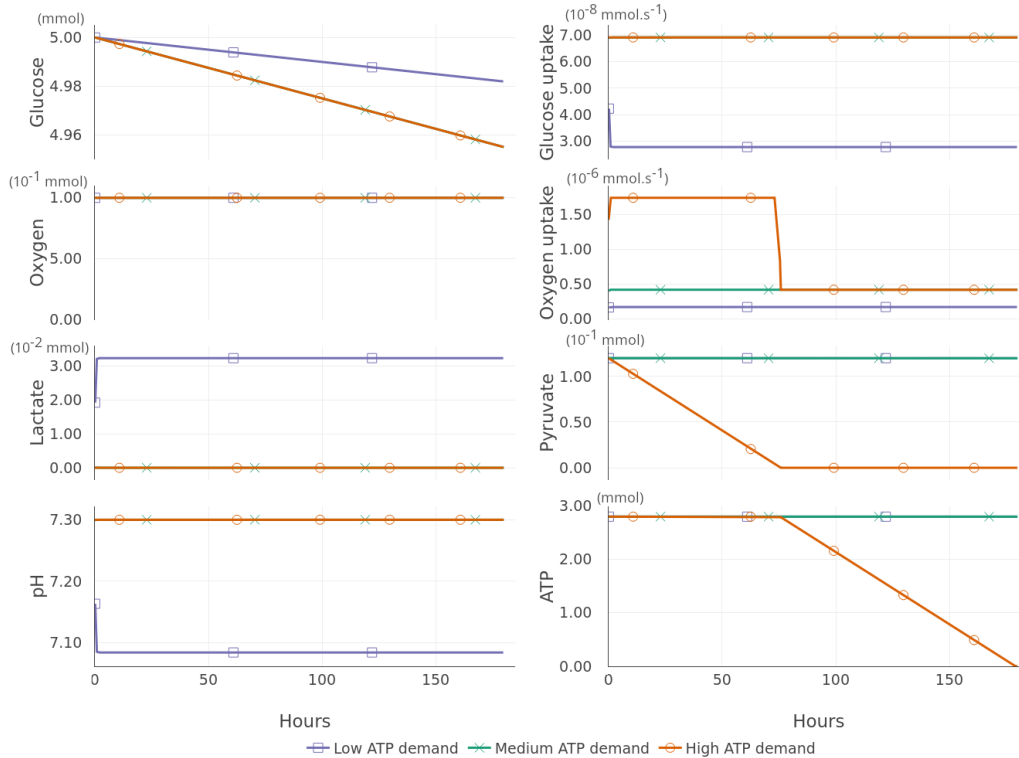


Figure 4. Evolution of the main metabolic molecules and uptake rates of glucose and oxygen as a function of the cell energy demand from low to high. Oxygen is non-limiting.

Figure 5 shows the *limiting oxygen case*, where oxygen is rapidly consumed over time. There are three oxygen

drop intensities which are related to the three levels of ATP demand. For the low ATP demand, we initially observe the same dynamics as in the previous case: the production of pyruvate (by glycolysis) is greater than the consumption of pyruvate (via OXPHOS). The surplus of pyruvate is converted into lactate and comes out of the cell with a proton until the pH stabilizes, indicating the equilibrium between OXPHOS and glycolysis. As soon as anoxia is reached, OXPHOS stops and the pyruvate is entirely converted into lactate. Lactate is excreted and this leads to a second acidic drop.

For the high ATP demand, there is a strong decrease in pyruvate since OXPHOS consumes more pyruvate than glycolysis can produce. As soon as the oxygen disappears, OXPHOS stops and the pyruvate pool fills up. During the initial decrease in oxygen, glucose uptake transiently increases to saturation (limited uptake capacity). This dramatically increases the acidity which ultimately leads to the collapse of glucose uptake.

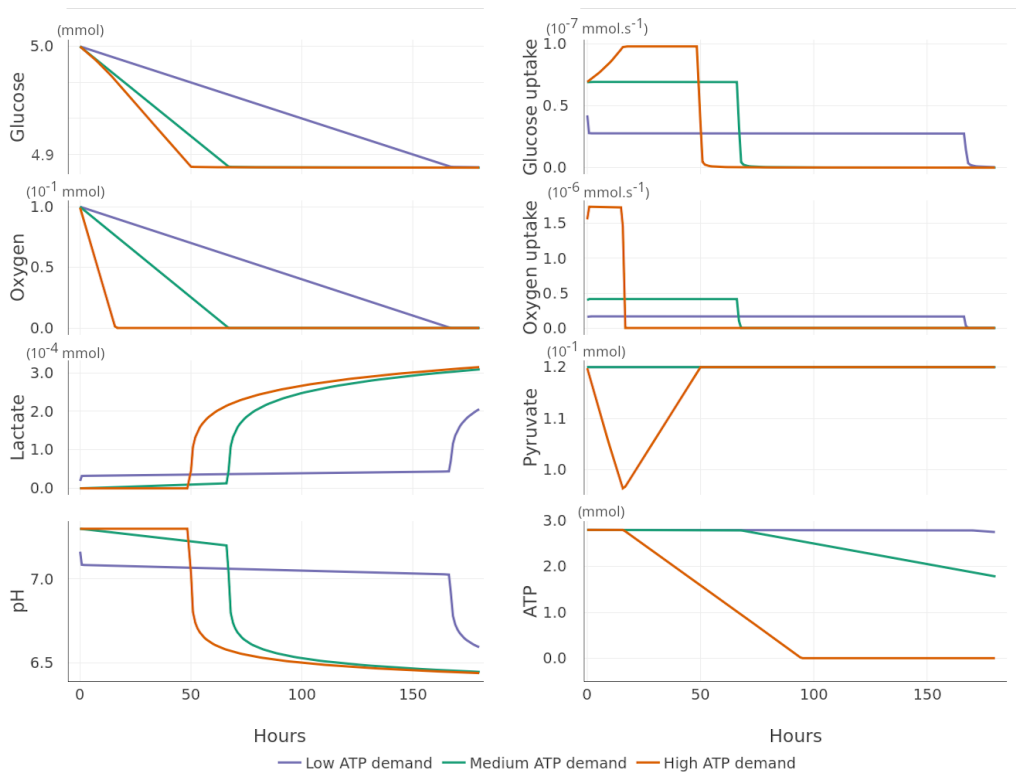


Figure 5. Evolution of the main metabolic molecules and uptake rates of glucose and oxygen as a function of the cell energy demand from low to high. Oxygen is limiting.

Figure 6 presents a case with *varying oxygen conditions* which can be considered as a proxy for tumor angiogenesis. It is well known that the angiogenic network is very unstable leading to oscillating oxygen conditions with a wide range of periodicities ranging from seconds to several hours [43]. We have chosen here to simulate the oxygen cycle with a periodicity of 20 hours. This periodicity was chosen to enhance the observed effects and increase the contrast with the previous case.

For the high ATP demand, we again observe the same dynamics as in the previous cases. Pyruvate is completely depleted in OXPHOS. At first, the amount of pyruvate remains sufficient in the cell, despite its decrease, until it drops down. Small amounts are cyclically restored by glycolysis and are instantly consumed as soon as the oxygen level allows.

When the energy load is lower, sustained oscillations of lactate and pH are observed, caused by the periodic shutdown of OXPHOS. The frequency of oxygen oscillations is fast enough to maintain an almost constant level of pyruvate restored by lactate. We note that we did not take into account the time required to convert lactate to pyruvate - in our

model it is considered an instantaneous process - this leads to sharp pH oscillations which are not observed experimentally. However our goal at this point is to highlight the possible emerging metabolic behaviors rather than being quantitatively realistic.

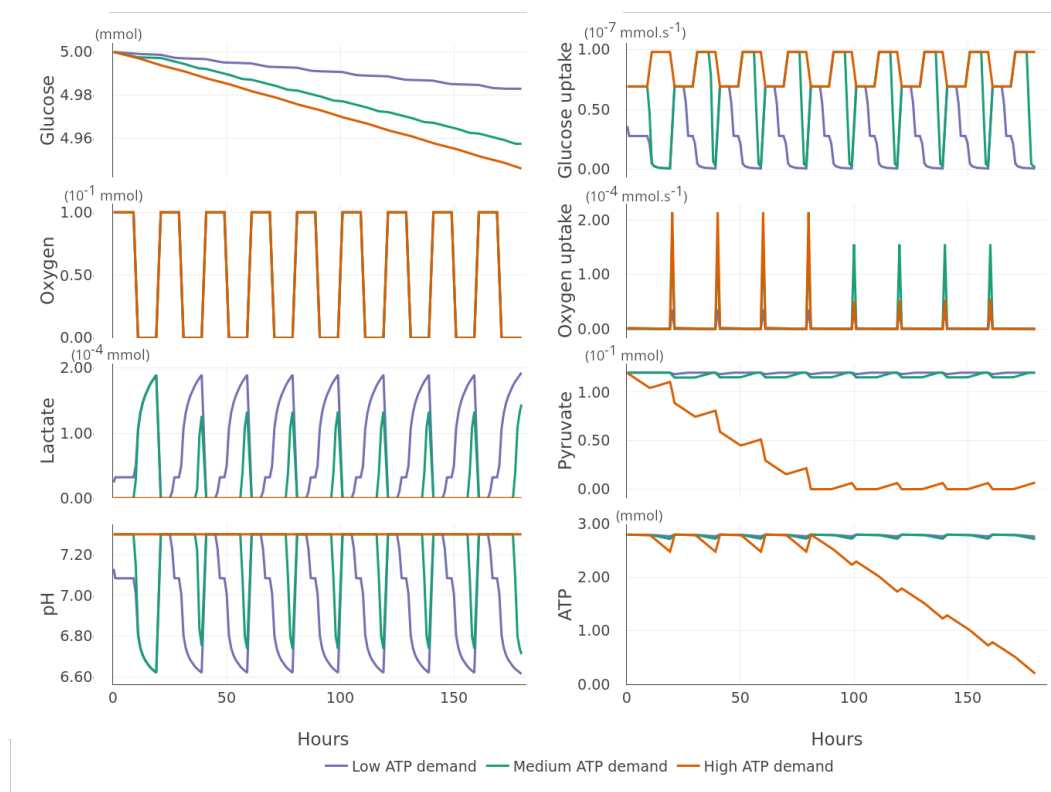


Figure 6. Evolution of the main metabolic molecules and uptake rates of glucose and oxygen as a function of the cell energy demand from low to high. Oxygen is varying.

These results clearly show that - depending on the oxygen constraint - glycolysis and OXPHOS cooperate to sustain, as far as possible, the energy demand in terms of ATP production. This cooperation is mediated by the amount of pyruvate which is the product of the first and source of the second. This contradicts a *switch mechanism* of the metabolism which implies an alternate and exclusive (*i.e.* dual) functioning of the two metabolic modes.

3.3. Metabolism at the cell population level

The spatial dimension is often overlooked in most studies of cell metabolism, including theoretical and experimental approaches. In the first case, most models focus on the mechanisms on individual cells (as we have done so far) and in the second experimental case, most of the measurements are made at the level of the entire cell populations, either on two dimensional cell cultures or on three dimensional spheroids. Extracellular Flux Analysers (Seahorse) [44] are widely used to characterize cell metabolisms based on measurements of OCR (Oxygen Consumption Rate) and ECAR (Extracellular Acidification Rate). However, these measurements reflect the average values for the entire cell population, when in fact a high discrepancy exists between cells depending on the local environmental context and cell state [45, 46]. While the use of this device makes more sense for two dimensional cell cultures, where the environment is assumed to be homogeneous, it is clearly not suitable for spheroids where the inner cells do not have the same access to resources compared to the peripheral cells.

In this section, we aim to specifically highlight the heterogeneity that exists in a spheroid due to the gradients of the main substrates from the periphery to the core (Fig. 7, upper graph). These gradients are mainly due to the

increase in the density of cells in the center which consume more nutrients and impede their diffusion. As a result, resource gradients (oxygen and glucose) induce the emergence of different metabolic states depending on cell depth in the spheroid. For the simulation shown in figure 7, the initial radius of the cell is $8.41\mu\text{m}$, the cell density is 9×10^4 cells/ μl and the diameter of the spheroid is $800\mu\text{m}$ at the end of the simulation. The simulation is performed on a cubic domain $1020\mu\text{m}$ wide. The initial state corresponds to a tumor spheroid immersed in a highly hypoxic environment. To highlight the different metabolic states that can be encountered, we did not consider the cell states transitions from proliferation to necrosis. However we took into account the increase in cell cycle duration induced by the lack of oxygen and mediated by HIF-1 α [47].

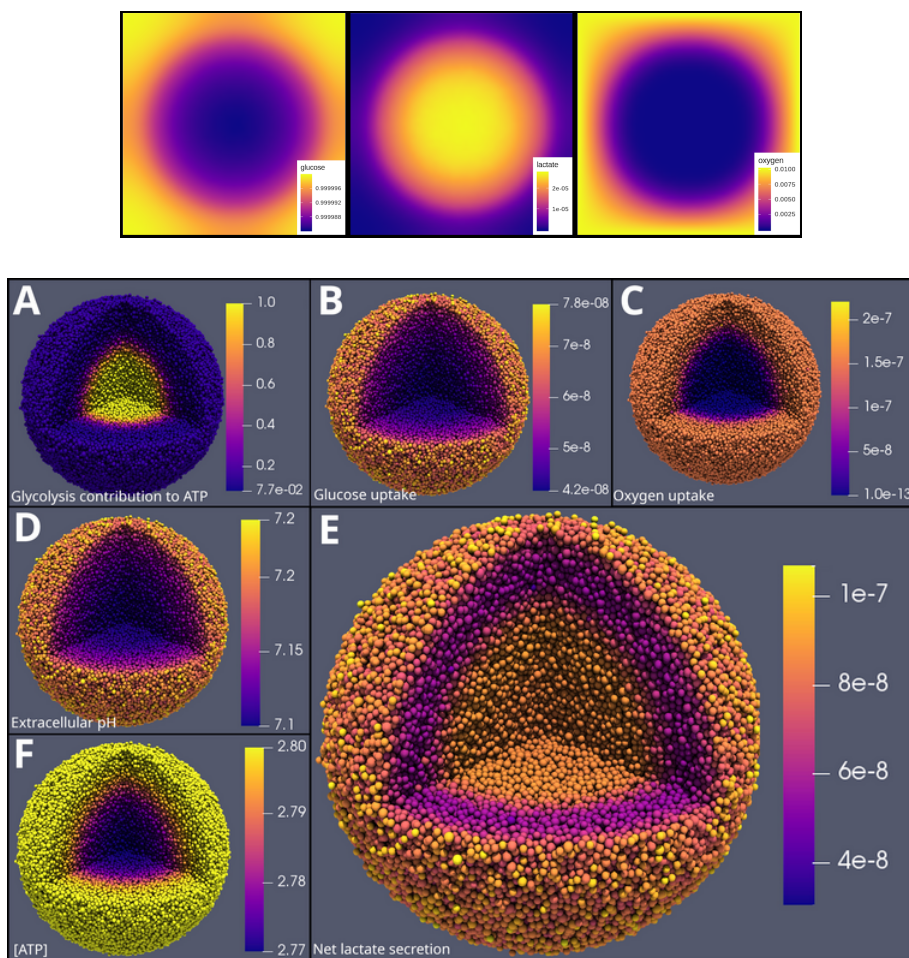


Figure 7. Upper graph: distribution of molecules and acidity in the medium of the spheroid simulation. From left to right: Glucose concentration in mM (initial concentration in the medium: 1mM); Lactate concentration in mM (initial concentration in the medium: 0mM); Oxygen concentration in mM. The oxygen concentration is fixed (0.01 mM) at the boundary of the simulation domain. Spheroid simulation at 10 days using Physicell[39]. Initial medium concentrations: 2mM glucose, 0.01mM oxygen, pH=7.3, no lactate. Each figure represents the same spheroid with coloration for different parameters. **A.** Glycolysis contribution to ATP production; **B.** Glucose uptake in $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}$; **C.** Oxygen uptake in $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}$; **D.** Extracellular pH; **E.** Net lactate secretion in $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}$; **F.** ATP level in mM.

Figure 7A clearly shows that the contribution of glycolysis is much higher at the center where the oxygen level is low (Fig. 7, upper graph). Consequently, the pH is lower in the center and is directly correlated with the glucose uptake gradient (Fig. 7D and 7B). On the other hand, the oxygen uptake gradient is steeper from the center to the periphery because the oxygen consumption is higher than glucose and its initial concentration is lower which makes it more sensitive to depletion (Fig. 7C). The net secretion of lactate presents an interesting profile (Fig. 7E) with a

middle layer of lower secretion. This is explained by a high OXPHOS activity requiring pyruvate at the level of the outer layer. This leads to a lower level of secreted lactate as glycolysis is slightly diminished from the periphery. At the other end, in the center, OXPHOS is greatly reduced because the oxygen level is low. This reduces the need for pyruvate (by OXPHOS), so excess pyruvate is converted to lactate. The net secretion of lactate thus reaches almost the same level at the heart of the spheroid than at its periphery. Finally, ATP is globally maintained around its basal level, except in the center where oxygen is low and OXPHOS is reduced (Fig. 7F). We note that glycolysis is not able to maintain the level of ATP. This would typically induce a transition to a reduced metabolism such as quiescence. However, the cell usually reduces its energy needs long before it runs out of ATP, because HIF triggers the entry into quiescence as the oxygen level is too low.

Figure 7E, which shows net lactate production, exhibits a non-homogeneous Warburg effect. Its intensity - defined by the importance of the contribution of glycolysis (Fig. 7A) - depends on the gradient stiffness of the substrates. Moreover, we observe here one instant of an evolving process which corresponds to a transient state. This shows that this effect is not a well-defined state with a switch-like dynamic but a progressive event. We note that our simulation is only one possible configuration given our choice of parameters. Other cases could be generated. For example, a sharper pH gradient from center to the periphery leading to extinction of glycolysis would have led to different scenarios of cell metabolism.

4. Discussion

The model of cell energy metabolism that we proposed in this study integrates the most recent knowledge. It is based on a number of key experimental observations and established facts. It is moreover adjusted and parameterized on the basis of experimental data. The model focuses on the glycolysis-OXPHOS relationship and in particular emphasizes the role of lactate as a substrate, as well as the central role of pyruvate in the regulation of metabolism. The latter makes the link between glycolysis, fermentation and OXPHOS (after conversion in the TCA cycle).

The oxidation of pyruvate requires that it be imported into the mitochondrial matrix and subjected to the activity of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex. The activity of this enzyme is regulated by several conditions, such as CoA levels, NAD⁺/NADH ratio. It is a relatively long process compared to fermentation. Glycolysis is less efficient than OXPHOS [48, 49, 8, 1] in terms of ATP produced per glucose molecule. However, in terms of ATP molecules produced by unit of time, glycolysis is a much faster process (about a hundred times faster [50]). It allows the cell to adapt quickly in order to meet immediate energy needs. Glycolysis is not efficient for the amount of glucose consumed but may be a better alternative than OXPHOS to produce energy very quickly to meet acute needs [51, 27]. When the glycolytic flux exceeds the maximum activity of PDH, the cell spontaneously converts pyruvate into lactate to get rid of the excess [48].

It is also interesting to note that while glucose consumption and lactate production decrease with pH, the concentration of intracellular lactate increases. This mechanism suggests that the cell recovers extracellular lactate to maintain its pyruvate level at a constant value. Indeed, under conditions of lactic acidosis, the protons level being higher outside the cell, the entry of lactate via the MCT1 transporter, is facilitated [19]. One could imagine this system as a hydraulic dam. The dam retain the pyruvates upstream, which finds its source in glycolysis. Depending on the energy needs, the dam is opened with more or less intensity (OXPHOS). Sometimes the level overflows, the dam then lets the surplus pass without producing energy. Pyruvate is then transformed into lactate. Conversely, when pyruvate is lacking, the dam is supplied by the source of lactate. The simulations that we carried out to observe how the imposed environmental constraints (*i.e.* the oxygen level and acidity) and the imposed energy needs push the cell to adapt, highlight this dam mechanism. Our results clearly show that glycolysis and OXPHOS are used concomitantly and cooperatively [21], with a gradation in their relative contributions to ATP production that depends on available resources and pH.

These results contrast somehow with the current view of tumor cell metabolism, which is portrayed as abnormal and characterized by increased glycolysis even in the presence of oxygen, the so-called Warburg effect. It seems im-

portant to us to stick to the original definition of the Warburg effect, which does not presuppose the presence of oxygen [5, 6, 51]. This effect - *i.e.* the overproduction of lactate - is recognized as a hallmark of cancer. However, recent experiments have shown that by acidifying its environment the tumor cell progressively self-inhibits this phenotype [19]. By integrating this observation into our model, our simulations show that the Warburg effect is indeed only transient (limited in time) and contextual (dependent on acidity). The increase in glycolytic activity in the presence of oxygen is not a specific phenomenon of cancer. There are brain regions that primarily use aerobic glycolysis [52], as well as endothelial cells during angiogenesis [53], and mesenchymal stem cells which primarily depend on glycolysis and require less oxygen [54]. It might be useful to recall that, from an evolutionary point of view, OXPHOS is a process that appeared after glycolysis. Primitive eukaryotic cells only became able to use oxygen after the endosymbiosis of proteobacteria. The eukaryotic cells have thus obtained by this mean an additional source of ATP production, complementary to glycolysis, and which has been preserved until now.

Temporality, and more particularly the time scale with which changes in metabolism develop, has been neglected despite its importance. On a short time scale, our results contribute to show that the early tumor cell is able to gradually adapt its metabolism and the metabolic changes are reversible [27]. On a longer time scale, the metabolic evolution most likely depends on the history of stress (frequency and intensity of hypoxic events) that the cell has undergone. It is well known that HIF-1 α stabilization with hypoxia is a powerful driver of genetic instability [55].

5. Conclusions

We have proposed a simplified model of cellular energy metabolism to demonstrate certain aspects of the glycolysis-OXPHOS relationship, in particular in the deregulated tumor microenvironment characterized by low oxygenation and a high level of acidity. The model was developed to manage the complexity of the different reactions and make sense of these reactions in space and time. The model, based on a few key experimental observations and well-established facts, emphasizes the role of lactate as a substrate. We first showed the central role of pyruvate in the regulation of metabolism. Our simulations also showed how imposed environmental constraints and imposed energy needs push the cell to adapt its metabolism to meet its needs. The results show the cooperation of the two metabolic modes which are not mutually exclusive. Our results thus tend to show that the Warburg effect is not necessarily an inherent characteristic of the tumor cell, but a spontaneous and transient adaptation mechanism to a disturbed environment. The notion of metabolic reprogramming associated with the Warburg effect is moreover questioned by several authors [56], emphasizing the fact that the adaptation of cellular metabolism is multifactorial and occurs at different levels beyond genetics and epigenetics. This could have implications for how therapies are viewed. The search for normalization of tumor acidity, for example, could become a good strategy.

Acknowledgements

This work is related to the POET project financed by INSERM/CNRS "Santé Numérique - 2019" (Grant Reference: 216669). We thank the Research Group GDR Imabio (<http://imabio-cnrs.fr>) for partial funding of P.J.'s work. We also wish to warmly thank Paul Macklin for his help and support with PhysiCell that we used to make the spheroid simulation.

References

- [1] S. Devic, Warburg effect - a consequence or the cause of carcinogenesis?, *Journal of Cancer* 7 (7) (2016) 817–822. doi:10.7150/jca.14274.
- [2] P. J. Bhat, L. Darunte, V. Kareenhalli, J. Dandekar, A. Kumar, Can metabolic plasticity be a cause for cancer? Warburg–Waddington legacy revisited, *Clinical Epigenetics* 2 (2) (2011) 113–122. doi:10.1007/s13148-011-0030-x. URL <http://www.clinicalepigeneticsjournal.com/content/2/2/>
- [3] J. H. van Beek, The dynamic side of the Warburg effect: glycolytic intermediate storage as buffer for fluctuating glucose and O₂ supply in tumor cells, *Frontiers in Oncology* 7 (2018) 1177. doi:10.12688/f1000research.15635.2.
- [4] O. Warburg, On the Origin of Cancer Cells, *Science* 123 (3191) (1956) 309–314. doi:10.1126/science.123.3191.309. URL <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.123.3191.309>

- [5] S. A. Mookerjee, A. A. Gerencser, D. G. Nicholls, M. D. Brand, Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements, *Journal of Biological Chemistry* 292 (17) (2017) 7189–7207. doi:10.1074/jbc.M116.774471.
- [6] A. Vazquez, J. Liu, Y. Zhou, Z. N. Oltvai, Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: The Warburg effect revisited, *BMC Systems Biology* 4 (1) (2010) 58. doi:10.1186/1752-0509-4-58.
URL <https://bmcsystbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-0509-4-58>
- [7] M. V. Liberti, J. W. Locasale, C. C. Biology, C. C. Biology, The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?, *Trends in Biochemical Sciences* 41 (3) (2016) 211–218. doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001.
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26778478><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4783224><https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000415002418>[http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000415002418](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000415002418%0Apapers3://publi)
- [8] R. A. Gatenby, R. J. Gillies, Why do cancers have high aerobic glycolysis?, *Nature Reviews Cancer* 4 (11) (2004) 891–899. doi:10.1038/nrc1478.
- [9] R. J. Gillies, I. Robey, R. A. Gatenby, Causes and Consequences of Increased Glucose Metabolism of Cancers, *Journal of Nuclear Medicine* 49 (Suppl_2) (2008) 24S–42S. doi:10.2967/jnumed.107.047258.
URL <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.107.047258>
- [10] C. Nazaret, J. P. Mazat, An old paper revisited: "A mathematical model of carbohydrate energy metabolism. Interaction between glycolysis, the Krebs cycle and the H-transporting shuttles at varying ATPases load" by V.V. Dynnik, R. Heinrich and E.E. Sel'kov, *Journal of Theoretical Biology* 252 (3) (2008) 520–529. doi:10.1016/j.jtbi.2008.01.003.
- [11] C. Phipps, H. Molavian, M. Kohandel, A microscale mathematical model for metabolic symbiosis: Investigating the effects of metabolic inhibition on ATP turnover in tumors, *Journal of Theoretical Biology* 366 (2015) 103–114. doi:10.1016/j.jtbi.2014.11.016.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.11.016>
- [12] M. B. Kuznetsov, A. V. Kolobov, Transient alleviation of tumor hypoxia during first days of antiangiogenic therapy as a result of therapy-induced alterations in nutrient supply and tumor metabolism – Analysis by mathematical modeling, *Journal of Theoretical Biology* 451 (2018) 86–100. doi:10.1016/j.jtbi.2018.04.035.
URL <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.04.035>
- [13] R. Venkatasubramanian, M. A. Henson, N. S. Forbes, Incorporating energy metabolism into a growth model of multicellular tumor spheroids, *Journal of Theoretical Biology* 242 (2) (2006) 440–453. doi:10.1016/j.jtbi.2006.03.011.
- [14] M. Shan, D. Dai, A. Vudem, J. D. Varner, A. D. Stroock, Multi-scale computational study of the Warburg effect, reverse Warburg effect and glutamine addiction in solid tumors, *PLoS Computational Biology* 14 (12) (2018) e1006584. doi:10.1371/journal.pcbi.1006584.
URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1006584>
- [15] J. J. Casciari, S. V. Sotirchos, R. M. Sutherland, Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH, *Journal of Cellular Physiology* 151 (2) (1992) 386–394. doi:10.1002/jcp.1041510220.
URL <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.1041510220>
- [16] J. J. Casciari, S. V. Sotirchos, R. M. Sutherland, Mathematical modelling of microenvironment and growth in emt6/ro multicellular tumour spheroids, *Cell Proliferation* 25 (1) (1992) 1–22. arXiv:<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2184.1992.tb01433.x>. doi:10.1111/j.1365-2184.1992.tb01433.x.
URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2184.1992.tb01433.x>
- [17] N. Jagiella, B. Müller, M. Müller, I. E. Vignon-Clementel, D. Drasdo, Inferring Growth Control Mechanisms in Growing Multi-cellular Spheroids of NSCLC Cells from Spatial-Temporal Image Data, *PLOS Computational Biology* 12 (2) (2016) e1004412. doi:10.1371/journal.pcbi.1004412.
URL <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1004412>
- [18] C. DuBois, J. Farnham, E. Aaron, A. Radunskaya, A multiple time-scale computational model of a tumor and its micro environment, *Mathematical Biosciences and Engineering* 10 (1) (2012) 121–150. doi:10.3934/mbe.2013.10.121.
- [19] J. Xie, H. Wu, C. Dai, Q. Pan, Z. Ding, D. Hu, B. Ji, Y. Luo, X. Hu, Beyond Warburg effect - Dual metabolic nature of cancer cells, *Scientific Reports* 4 (2014) 1–12. doi:10.1038/srep04927.
- [20] X. Hu, M. Chao, H. Wu, Central role of lactate and proton in cancer cell resistance to glucose deprivation and its clinical translation, *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2 (December 2016) (2017) 16047. doi:10.1038/sigtrans.2016.47.
URL <http://dx.doi.org/10.1038/sigtrans.2016.47>
- [21] J. Zheng, Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (review), *Oncology Letters* 4 (6) (2012) 1151–1157. doi:10.3892/ol.2012.928.
URL <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2012.928>
- [22] P. Rich, The molecular machinery of Keilin's respiratory chain, *Biochemical Society Transactions* 31 (6) (2003) 1095–1105. doi:10.1042/bst0311095.
URL <http://www.biochemsoctrans.org/cgi/doi/10.1042/bst0311095>
- [23] P. C. Hinkle, P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1706 (1-2) (2005) 1–11. doi:10.1016/j.bbabi.2004.09.004.
URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272804002701>
- [24] K. Ashizawa, M. C. Willingham, C. M. Liang, S. Y. Cheng, In vivo regulation of monomer-tetramer conversion of pyruvate kinase subtype M2 by glucose is mediated via fructose 1,6-bisphosphate, *Journal of Biological Chemistry* 266 (25) (1991) 16842–16846.
- [25] S. Mazurek, C. B. Boschek, F. Hugo, E. Eigenbrodt, Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading, *Seminars in Cancer Biology* 15 (4) (2005) 300–308. doi:10.1016/j.semcancer.2005.04.009.
URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X0500026X>
- [26] W. Mueller-Klieser, J. P. Freyer, R. M. Sutherland, Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids, *British Journal of Cancer* 53 (3) (1986) 345–353. doi:10.1038/bjc.1986.58.

- [27] H. Wu, M. Ying, X. Hu, Lactic acidosis switches cancer cells from aerobic glycolysis back to dominant oxidative phosphorylation, *Oncotarget* 7 (26) (2016) 36–38. doi:10.18632/oncotarget.9746.
- [28] S. Fulda, K.-M. M. Debatin, HIF-1-regulated glucose metabolism: A key to apoptosis resistance?, *Cell Cycle* 6 (7) (2007) 790–792. doi:10.4161/cc.6.7.4084.
URL <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.6.7.4084>
- [29] K. Dietl, K. Renner, K. Dettmer, B. Timischl, K. Eberhart, C. Dorn, C. Hellerbrand, M. Kastner, L. A. Kunz-Schughart, P. J. Oefner, R. Andreesen, E. Gottfried, M. P. Kreutz, Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes, *The Journal of Immunology* 184 (3) (2010) 1200–1209. doi:10.4049/jimmunol.0902584.
URL <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0902584>
- [30] M. P. Fellenz, L. E. Gerweck, Influence of Extracellular pH on Intracellular pH and Cell Energy Status: Relationship to Hyperthermic Sensitivity, *Radiation Research* 116 (2) (1988) 305. doi:10.2307/3577466.
URL <https://www.jstor.org/stable/3577466?origin=crossref>
- [31] I. F. Robey, A. D. Lien, S. J. Welsh, B. K. Baggett, R. J. Gillies, Hypoxia-Inducible Factor-1 α and the Glycolytic Phenotype in Tumors, *Neoplasia* 7 (4) (2005) 324–330. doi:10.1593/neo.04430.
URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558605800636>
- [32] R. Courtney, D. C. Ngo, N. Malik, K. Ververis, S. M. Tortorella, T. C. Karagiannis, Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K, *Molecular Biology Reports* 42 (4) (2015) 841–851. doi:10.1007/s11033-015-3858-x.
URL <http://link.springer.com/10.1007/s11033-015-3858-x>
- [33] H. Choudhry, A. L. Harris, Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology, *Cell Metabolism* 27 (2) (2018) 281–298. doi:10.1016/j.cmet.2017.10.005.
URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413117306174>
- [34] M. L. Halperin, H. P. Connors, A. S. Relman, M. L. Karnovsky, Factors that control the effect of pH on glycolysis in leukocytes., *The Journal of biological chemistry* 244 (2) (1969) 384–90.
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4237582>
- [35] D. F. Wilson, Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism, *Journal of Physiology* 595 (23) (2017) 7023–7038. doi:10.1113/JP273839.
URL <http://doi.wiley.com/10.1113/JP273839>
- [36] N. Vijay, M. Morris, Role of Monocarboxylate Transporters in Drug Delivery to the Brain, *Current Pharmaceutical Design* 20 (10) (2014) 1487–1498. doi:10.2174/13816128113199990462.
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23789956>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4084603>
<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=20&issue=10&spage=1487>
- [37] A. Talaiezhadeh, A. Shahriari, M. Tabandeh, P. Fathizadeh, S. Mansouri, Kinetic characterization of lactate dehydrogenase in normal and malignant human breast tissues, *Cancer Cell International* 15 (1) (2015) 19. doi:10.1186/s12935-015-0171-7.
URL <http://www.cancerci.com/content/15/1/19>
- [38] C. Rackauckas, Q. Nie, DifferentialEquations.jl – A Performant and Feature-Rich Ecosystem for Solving Differential Equations in Julia, *Journal of Open Research Software* 5. doi:10.5334/jors.151.
URL <http://openresearchsoftware.metajnl.com/articles/10.5334/jors.151/>
- [39] A. Ghaffarizadeh, R. Heiland, S. H. Friedman, S. M. Mumenthaler, P. Macklin, PhysiCell: An open source physics-based cell simulator for 3-D multicellular systems, *PLOS Computational Biology* 14 (2) (2018) e1005991. doi:10.1371/journal.pcbi.1005991.
URL <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1005991>
- [40] G. M. Cooper, R. E. Hausman, *The Cell: A Molecular Approach* 2nd Edition, 2007.
- [41] T. Epstein, R. A. Gatenby, J. S. Brown, The Warburg effect as an adaptation of cancer cells to rapid fluctuations in energy demand, *PLoS ONE* 12 (9) (2017) 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0185085.
- [42] N. Yalamanchili, A. Kriete, D. Alfego, K. M. Danowski, C. Kari, U. Rodeck, Distinct Cell Stress Responses Induced by ATP Restriction in Quiescent Human Fibroblasts, *Frontiers in Genetics* 7 (OCT). doi:10.3389/fgene.2016.00171.
URL <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2016.00171>
- [43] M. W. Dewhirst, Relationships between Cycling Hypoxia, HIF-1, Angiogenesis and Oxidative Stress, *Radiation Research* 172 (6) (2009) 653–665. doi:10.1667/RR1926.1.
URL <http://www.bioone.org/doi/10.1667/RR1926.1>
- [44] J. Zhang, Q. Zhang, Using Seahorse Machine to Measure OCR and ECAR in Cancer Cells, in: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1928, 2019, pp. 353–363. doi:10.1007/978-1-4939-9027-6{_}18.
URL http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9027-6_18
- [45] P. Danhier, P. Bañski, V. L. Payen, D. Grasso, L. Ippolito, P. Sonveaux, P. E. Porporato, Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1858 (8) (2017) 556–572. doi:10.1016/j.bbabi.2017.02.001.
URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272817300233>
- [46] T. M. Heaster, B. A. Landman, M. C. Skala, Quantitative spatial analysis of metabolic heterogeneity across in vivo and in vitro tumor models, *Frontiers in Oncology* 9. doi:10.3389/fonc.2019.01144.
- [47] B. Bedessem, A. Stéphanou, A mathematical model of HIF-1 α -mediated response to hypoxia on the G1/S transition, *Mathematical Biosciences* 248 (1) (2014) 31–39. doi:10.1016/j.mbs.2013.11.007.
- [48] R. J. DeBerardinis, J. J. Lum, G. Hatzivassiliou, C. B. Thompson, The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation, *Cell Metabolism* 7 (1) (2008) 11–20. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002.
- [49] D. Hanahan, R. A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell* 144 (5) (2011) 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>

- [50] S. Ganapathy-Kanniappan, J.-F. H. Geschwind, Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects, *Molecular Cancer* 12 (1) (2013) 152. doi:10.1186/1476-4598-12-152.
- [51] X. L. Zu, M. Guppy, Cancer metabolism: Facts, fantasy, and fiction, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313 (3) (2004) 459–465. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.136.
- [52] S. N. Vaishnavi, A. G. Vlassenko, M. M. Rundle, A. Z. Snyder, M. A. Mintun, M. E. Raichle, Regional aerobic glycolysis in the human brain, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (41) (2010) 17757–17762. doi:10.1073/pnas.1010459107. URL <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1010459107>
- [53] G. Fitzgerald, I. Soro-Arnaiz, K. De Bock, The Warburg effect in endothelial cells and its potential as an anti-angiogenic target in cancer, *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6 (2018) 100. doi:10.3389/fcell.2018.00100.
- [54] J. M. Funes, M. Quintero, S. Henderson, D. Martinez, U. Qureshi, C. Westwood, M. O. Clements, D. Bourboulia, R. B. Pedley, S. Moncada, C. Boshoff, Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (15) (2007) 6223–6228. doi:10.1073/pnas.0700690104. URL <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0700690104>
- [55] K. R. Luoto, R. Kumareswaran, R. G. Bristow, Tumor hypoxia as a driving force in genetic instability, *Genome Integrity* 4 (1) (2013) 5. doi:10.1186/2041-9414-4-5. URL <http://genomeintegrity.biomedcentral.com/articles/10.1186/2041-9414-4-5>
- [56] P. Jacquet, A. Stéphanou, Metabolic reprogramming, questioning, and implications for cancer., *Biology* 10. doi:10.3390/biology10020129.

A.3 Profils de pH intracellulaire en fonction du pH extracellulaire

Ces profils sont issus du travail de thèse de Alaa Tafech[214], membre de l'équipe, dont la thèse a été menée parallèlement à la mienne. L'un de ses objectifs a été de mesurer la capacité de régulation du pH intracellulaire de cellules de gliomes cultivées en sphéroïdes et soumises à différents pH extracellulaires. Elle a pour cela mis au point une nouvelle méthode de mesure ratiométrique de fluorescence, utilisant une sonde (le BCECF) pour mesurer le pH. Ici, les courbes qui nous intéressent, sont les pH intracellulaires mesurés au cours de 8 h après avoir exposés les sphéroïdes à un pH extracellulaire fixé.

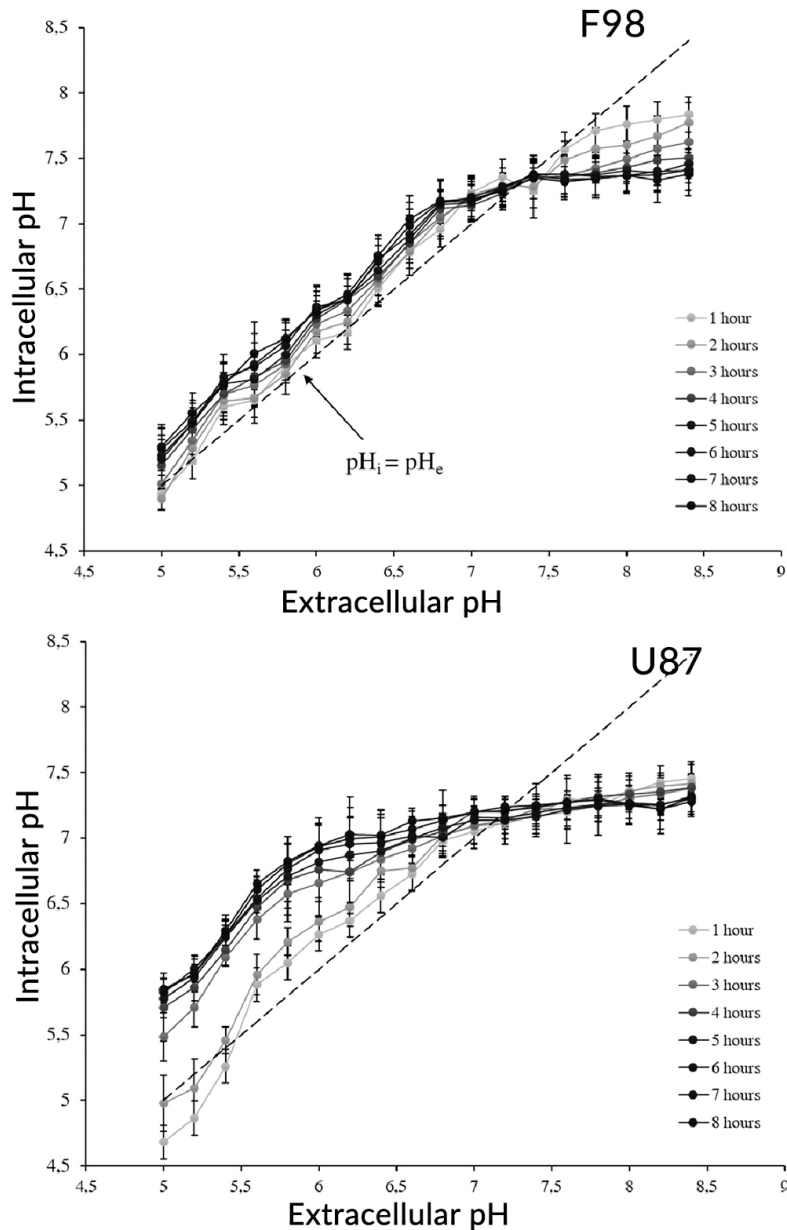


FIGURE A.1 – Profils de pH intracellulaire en fonction du pH extracellulaire. À gauche les cellules F98 (issues de gliome de rat) et à droite des cellules U87 (issues de glioblastomes humains) sont exposées à différents pH extracellulaires pendant 8 h et leurs pH intracellulaires correspondant sont mesurés.

A.4 Équations du modèle du chapitre 4

Est présenté ici l'ensemble du système d'équations différentielles ordinaires (56 équations, 119 paramètres simples et 4 matrices de paramètres de taille 53x53) définissant le modèle utilisé dans les simulations du chapitre 4. Elles décrivent l'évolution au cours du temps du niveau d'expression des gènes, d'enzymes ainsi que des concentrations en métabolites et valeurs des flux réactionnels.

$$\begin{aligned} \frac{dAkt}{dt} = & A_0 \cdot \left(\frac{AMPK^{n_{1,0}} \cdot \gamma_{1,0}}{AMPK^{n_{1,0}} + S_{1,0}^{n_{1,0}}} + \frac{S_{1,0}^{n_{1,0}}}{AMPK^{n_{1,0}} + S_{1,0}^{n_{1,0}}} \right) \cdot \left(\frac{PDK^{n_{7,0}} \cdot \gamma_{7,0}}{PDK^{n_{7,0}} + S_{7,0}^{n_{7,0}}} + \frac{S_{7,0}^{n_{7,0}}}{PDK^{n_{7,0}} + S_{7,0}^{n_{7,0}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{PI3K^{n_{8,0}} \cdot \gamma_{8,0}}{PI3K^{n_{8,0}} + S_{8,0}^{n_{8,0}}} + \frac{S_{8,0}^{n_{8,0}}}{PI3K^{n_{8,0}} + S_{8,0}^{n_{8,0}}} \right) - D_0 \cdot Akt \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dAMPK}{dt} = & A_1 \cdot \left(\frac{RAS^{n_{10,1}} \cdot \gamma_{10,1}}{RAS^{n_{10,1}} + S_{10,1}^{n_{10,1}}} + \frac{S_{10,1}^{n_{10,1}}}{RAS^{n_{10,1}} + S_{10,1}^{n_{10,1}}} \right) \cdot \left(\frac{VEGF^{n_{12,1}} \cdot \gamma_{12,1}}{VEGF^{n_{12,1}} + S_{12,1}^{n_{12,1}}} + \frac{S_{12,1}^{n_{12,1}}}{VEGF^{n_{12,1}} + S_{12,1}^{n_{12,1}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{HIF^{n_{3,1}} \cdot \gamma_{3,1}}{HIF^{n_{3,1}} + S_{3,1}^{n_{3,1}}} + \frac{S_{3,1}^{n_{3,1}}}{HIF^{n_{3,1}} + S_{3,1}^{n_{3,1}}} \right) \cdot \left(\frac{(R5P/lx_{42})^{n_{42,1}} \cdot \gamma_{42,1}}{(R5P/lx_{42})^{n_{42,1}} + S_{42,1}^{n_{42,1}}} + \frac{S_{42,1}^{n_{42,1}}}{(R5P/lx_{42})^{n_{42,1}} + S_{42,1}^{n_{42,1}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{\left(\frac{lx_{46} \cdot ATP}{lx_{48} \cdot AMP} \right)^{n_{48,1}} \cdot \gamma_{48,1}}{\left(\frac{lx_{46} \cdot ATP}{lx_{48} \cdot AMP} \right)^{n_{48,1}} + S_{48,1}^{n_{48,1}}} + \frac{S_{48,1}^{n_{48,1}}}{\left(\frac{lx_{46} \cdot ATP}{lx_{48} \cdot AMP} \right)^{n_{48,1}} + S_{48,1}^{n_{48,1}}} \right) - D_1 \cdot AMPK \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dcMyc}{dt} = & A_2 \cdot \left(\frac{Akt^{n_{0,2}} \cdot \gamma_{0,2}}{Akt^{n_{0,2}} + S_{0,2}^{n_{0,2}}} + \frac{S_{0,2}^{n_{0,2}}}{Akt^{n_{0,2}} + S_{0,2}^{n_{0,2}}} \right) \cdot \left(\frac{p53^{n_{6,2}} \cdot \gamma_{6,2}}{p53^{n_{6,2}} + S_{6,2}^{n_{6,2}}} + \frac{S_{6,2}^{n_{6,2}}}{p53^{n_{6,2}} + S_{6,2}^{n_{6,2}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{(ROS/lx_{52})^{n_{52,2}} \cdot \gamma_{52,2}}{(ROS/lx_{52})^{n_{52,2}} + S_{52,2}^{n_{52,2}}} + \frac{S_{52,2}^{n_{52,2}}}{(ROS/lx_{52})^{n_{52,2}} + S_{52,2}^{n_{52,2}}} \right) - D_2 \cdot cMyc \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dHIF}{dt} = & A_3 \cdot \left(\frac{RAS^{n_{10,3}} \cdot \gamma_{10,3}}{RAS^{n_{10,3}} + S_{10,3}^{n_{10,3}}} + \frac{S_{10,3}^{n_{10,3}}}{RAS^{n_{10,3}} + S_{10,3}^{n_{10,3}}} \right) \cdot \left(\frac{cMyc^{n_{2,3}} \cdot \gamma_{2,3}}{cMyc^{n_{2,3}} + S_{2,3}^{n_{2,3}}} + \frac{S_{2,3}^{n_{2,3}}}{cMyc^{n_{2,3}} + S_{2,3}^{n_{2,3}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{mTOR^{n_{4,3}} \cdot \gamma_{4,3}}{mTOR^{n_{4,3}} + S_{4,3}^{n_{4,3}}} + \frac{S_{4,3}^{n_{4,3}}}{mTOR^{n_{4,3}} + S_{4,3}^{n_{4,3}}} \right) \cdot \left(\frac{p53^{n_{6,3}} \cdot \gamma_{6,3}}{p53^{n_{6,3}} + S_{6,3}^{n_{6,3}}} + \frac{S_{6,3}^{n_{6,3}}}{p53^{n_{6,3}} + S_{6,3}^{n_{6,3}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{PTEN^{n_{9,3}} \cdot \gamma_{9,3}}{PTEN^{n_{9,3}} + S_{9,3}^{n_{9,3}}} + \frac{S_{9,3}^{n_{9,3}}}{PTEN^{n_{9,3}} + S_{9,3}^{n_{9,3}}} \right) \cdot \left(\frac{(Lactate/lx_{41})^{n_{41,3}} \cdot \gamma_{41,3}}{(Lactate/lx_{41})^{n_{41,3}} + S_{41,3}^{n_{41,3}}} + \frac{S_{41,3}^{n_{41,3}}}{(Lactate/lx_{41})^{n_{41,3}} + S_{41,3}^{n_{41,3}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{(ROS/lx_{52})^{n_{52,3}} \cdot \gamma_{52,3}}{(ROS/lx_{52})^{n_{52,3}} + S_{52,3}^{n_{52,3}}} + \frac{S_{52,3}^{n_{52,3}}}{(ROS/lx_{52})^{n_{52,3}} + S_{52,3}^{n_{52,3}}} \right) - D_3 \cdot HIF \cdot \left(\frac{O_2^{O_{2n}} \cdot O_{2\gamma}^{O_{2n}}}{O_2^{O_{2n}} + O_{2s}^{O_{2n}}} + \frac{O_{2s}^{O_{2n}}}{O_2^{O_{2n}} + O_{2s}^{O_{2n}}} \right) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dmTOR}{dt} = & A_4 \cdot \left(\frac{\text{Akt}^{n_{0,4}} \cdot \gamma_{0,4}}{\text{Akt}^{n_{0,4}} + S_{0,4}^{n_{0,4}}} + \frac{S_{0,4}^{n_{0,4}}}{\text{Akt}^{n_{0,4}} + S_{0,4}^{n_{0,4}}} \right) \cdot \left(\frac{\text{AMPK}^{n_{1,4}} \cdot \gamma_{1,4}}{\text{AMPK}^{n_{1,4}} + S_{1,4}^{n_{1,4}}} + \frac{S_{1,4}^{n_{1,4}}}{\text{AMPK}^{n_{1,4}} + S_{1,4}^{n_{1,4}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{\text{PI3K}^{n_{8,4}} \cdot \gamma_{8,4}}{\text{PI3K}^{n_{8,4}} + S_{8,4}^{n_{8,4}}} + \frac{S_{8,4}^{n_{8,4}}}{\text{PI3K}^{n_{8,4}} + S_{8,4}^{n_{8,4}}} \right) - D_4 \cdot mTOR \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dNOX}{dt} = & A_5 \cdot \left(\frac{\text{RAS}^{n_{10,5}} \cdot \gamma_{10,5}}{\text{RAS}^{n_{10,5}} + S_{10,5}^{n_{10,5}}} + \frac{S_{10,5}^{n_{10,5}}}{\text{RAS}^{n_{10,5}} + S_{10,5}^{n_{10,5}}} \right) \cdot \left(\frac{\text{AMPK}^{n_{1,5}} \cdot \gamma_{1,5}}{\text{AMPK}^{n_{1,5}} + S_{1,5}^{n_{1,5}}} + \frac{S_{1,5}^{n_{1,5}}}{\text{AMPK}^{n_{1,5}} + S_{1,5}^{n_{1,5}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,5}} \cdot \gamma_{3,5}}{\text{HIF}^{n_{3,5}} + S_{3,5}^{n_{3,5}}} + \frac{S_{3,5}^{n_{3,5}}}{\text{HIF}^{n_{3,5}} + S_{3,5}^{n_{3,5}}} \right) \cdot \left(\frac{(\text{ROS}/lx_{52})^{n_{52,5}} \cdot \gamma_{52,5}}{(\text{ROS}/lx_{52})^{n_{52,5}} + S_{52,5}^{n_{52,5}}} + \frac{S_{52,5}^{n_{52,5}}}{(\text{ROS}/lx_{52})^{n_{52,5}} + S_{52,5}^{n_{52,5}}} \right) - D_5 \cdot NOX \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dp53}{dt} = & A_6 \cdot \left(\frac{\text{Akt}^{n_{0,6}} \cdot \gamma_{0,6}}{\text{Akt}^{n_{0,6}} + S_{0,6}^{n_{0,6}}} + \frac{S_{0,6}^{n_{0,6}}}{\text{Akt}^{n_{0,6}} + S_{0,6}^{n_{0,6}}} \right) \cdot \left(\frac{\text{SOD}^{n_{11,6}} \cdot \gamma_{11,6}}{\text{SOD}^{n_{11,6}} + S_{11,6}^{n_{11,6}}} + \frac{S_{11,6}^{n_{11,6}}}{\text{SOD}^{n_{11,6}} + S_{11,6}^{n_{11,6}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{\text{PTEN}^{n_{9,6}} \cdot \gamma_{9,6}}{\text{PTEN}^{n_{9,6}} + S_{9,6}^{n_{9,6}}} + \frac{S_{9,6}^{n_{9,6}}}{\text{PTEN}^{n_{9,6}} + S_{9,6}^{n_{9,6}}} \right) - D_6 \cdot p53 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dPDK}{dt} = & A_7 \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,7}} \cdot \gamma_{3,7}}{\text{HIF}^{n_{3,7}} + S_{3,7}^{n_{3,7}}} + \frac{S_{3,7}^{n_{3,7}}}{\text{HIF}^{n_{3,7}} + S_{3,7}^{n_{3,7}}} \right) \cdot \left(\frac{p53^{n_{6,7}} \cdot \gamma_{6,7}}{p53^{n_{6,7}} + S_{6,7}^{n_{6,7}}} + \frac{S_{6,7}^{n_{6,7}}}{p53^{n_{6,7}} + S_{6,7}^{n_{6,7}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{\left(\frac{lx_{47} \cdot \text{ATP}}{lx_{48} \cdot \text{ADP}} \right)^{n_{48,7}} \cdot \gamma_{48,7}}{\left(\frac{lx_{47} \cdot \text{ATP}}{lx_{48} \cdot \text{ADP}} \right)^{n_{48,7}} + S_{48,7}^{n_{48,7}}} + \frac{S_{48,7}^{n_{48,7}}}{\left(\frac{lx_{47} \cdot \text{ATP}}{lx_{48} \cdot \text{ADP}} \right)^{n_{48,7}} + S_{48,7}^{n_{48,7}}} \right) - D_7 \cdot PDK \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dPI3K}{dt} = & A_8 \cdot \left(\frac{\text{RAS}^{n_{10,8}} \cdot \gamma_{10,8}}{\text{RAS}^{n_{10,8}} + S_{10,8}^{n_{10,8}}} + \frac{S_{10,8}^{n_{10,8}}}{\text{RAS}^{n_{10,8}} + S_{10,8}^{n_{10,8}}} \right) \cdot \left(\frac{\text{PTEN}^{n_{9,8}} \cdot \gamma_{9,8}}{\text{PTEN}^{n_{9,8}} + S_{9,8}^{n_{9,8}}} + \frac{S_{9,8}^{n_{9,8}}}{\text{PTEN}^{n_{9,8}} + S_{9,8}^{n_{9,8}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{(\text{Lactate}/lx_{41})^{n_{41,8}} \cdot \gamma_{41,8}}{(\text{Lactate}/lx_{41})^{n_{41,8}} + S_{41,8}^{n_{41,8}}} + \frac{S_{41,8}^{n_{41,8}}}{(\text{Lactate}/lx_{41})^{n_{41,8}} + S_{41,8}^{n_{41,8}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{(\text{ROS}/lx_{52})^{n_{52,8}} \cdot \gamma_{52,8}}{(\text{ROS}/lx_{52})^{n_{52,8}} + S_{52,8}^{n_{52,8}}} + \frac{S_{52,8}^{n_{52,8}}}{(\text{ROS}/lx_{52})^{n_{52,8}} + S_{52,8}^{n_{52,8}}} \right) - D_8 \cdot PI3K \end{aligned}$$

$$\frac{dPTEN}{dt} = A_9 \cdot \left(\frac{p53^{n_{6,9}} \cdot \gamma_{6,9}}{p53^{n_{6,9}} + S_{6,9}^{n_{6,9}}} + \frac{S_{6,9}^{n_{6,9}}}{p53^{n_{6,9}} + S_{6,9}^{n_{6,9}}} \right) - D_9 \cdot PTEN$$

$$\begin{aligned} \frac{dRAS}{dt} = A_{10} \cdot & \left(\frac{VEGF^{n_{12,10}} \cdot \gamma_{12,10}}{VEGF^{n_{12,10}} + S_{12,10}^{n_{12,10}}} + \frac{S_{12,10}^{n_{12,10}}}{VEGF^{n_{12,10}} + S_{12,10}^{n_{12,10}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{(ROS/lx_{52})^{n_{52,10}} \cdot \gamma_{52,10}}{(ROS/lx_{52})^{n_{52,10}} + S_{52,10}^{n_{52,10}}} + \frac{S_{52,10}^{n_{52,10}}}{(ROS/lx_{52})^{n_{52,10}} + S_{52,10}^{n_{52,10}}} \right) - D_{10} \cdot RAS \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dSOD}{dt} = A_{11} \cdot & \left(\frac{VEGF^{n_{12,11}} \cdot \gamma_{12,11}}{VEGF^{n_{12,11}} + S_{12,11}^{n_{12,11}}} + \frac{S_{12,11}^{n_{12,11}}}{VEGF^{n_{12,11}} + S_{12,11}^{n_{12,11}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{(ROS/lx_{52})^{n_{52,11}} \cdot \gamma_{52,11}}{(ROS/lx_{52})^{n_{52,11}} + S_{52,11}^{n_{52,11}}} + \frac{S_{52,11}^{n_{52,11}}}{(ROS/lx_{52})^{n_{52,11}} + S_{52,11}^{n_{52,11}}} \right) - D_{11} \cdot SOD \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dVEGF}{dt} = A_{12} \cdot & \left(\frac{cMyc^{n_{2,12}} \cdot \gamma_{2,12}}{cMyc^{n_{2,12}} + S_{2,12}^{n_{2,12}}} + \frac{S_{2,12}^{n_{2,12}}}{cMyc^{n_{2,12}} + S_{2,12}^{n_{2,12}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{HIF^{n_{3,12}} \cdot \gamma_{3,12}}{HIF^{n_{3,12}} + S_{3,12}^{n_{3,12}}} + \frac{S_{3,12}^{n_{3,12}}}{HIF^{n_{3,12}} + S_{3,12}^{n_{3,12}}} \right) \cdot \left(\frac{PI3K^{n_{8,12}} \cdot \gamma_{8,12}}{PI3K^{n_{8,12}} + S_{8,12}^{n_{8,12}}} + \frac{S_{8,12}^{n_{8,12}}}{PI3K^{n_{8,12}} + S_{8,12}^{n_{8,12}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{(Lactate/lx_{41})^{n_{41,12}} \cdot \gamma_{41,12}}{(Lactate/lx_{41})^{n_{41,12}} + S_{41,12}^{n_{41,12}}} + \frac{S_{41,12}^{n_{41,12}}}{(Lactate/lx_{41})^{n_{41,12}} + S_{41,12}^{n_{41,12}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{(ROS/lx_{52})^{n_{52,12}} \cdot \gamma_{52,12}}{(ROS/lx_{52})^{n_{52,12}} + S_{52,12}^{n_{52,12}}} + \frac{S_{52,12}^{n_{52,12}}}{(ROS/lx_{52})^{n_{52,12}} + S_{52,12}^{n_{52,12}}} \right) - D_{12} \cdot VEGF \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dGluT1}{dt} = A_{13} \cdot & \left(\frac{Akt^{n_{0,13}} \cdot \gamma_{0,13}}{Akt^{n_{0,13}} + S_{0,13}^{n_{0,13}}} + \frac{S_{0,13}^{n_{0,13}}}{Akt^{n_{0,13}} + S_{0,13}^{n_{0,13}}} \right) \cdot \left(\frac{cMyc^{n_{2,13}} \cdot \gamma_{2,13}}{cMyc^{n_{2,13}} + S_{2,13}^{n_{2,13}}} + \frac{S_{2,13}^{n_{2,13}}}{cMyc^{n_{2,13}} + S_{2,13}^{n_{2,13}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{HIF^{n_{3,13}} \cdot \gamma_{3,13}}{HIF^{n_{3,13}} + S_{3,13}^{n_{3,13}}} + \frac{S_{3,13}^{n_{3,13}}}{HIF^{n_{3,13}} + S_{3,13}^{n_{3,13}}} \right) \cdot \left(\frac{p53^{n_{6,13}} \cdot \gamma_{6,13}}{p53^{n_{6,13}} + S_{6,13}^{n_{6,13}}} + \frac{S_{6,13}^{n_{6,13}}}{p53^{n_{6,13}} + S_{6,13}^{n_{6,13}}} \right) - D_{13} \cdot GluT1 \end{aligned}$$

$$\frac{dHK}{dt} = A_{14} \cdot \left(\frac{\text{Akt}^{n_{0,14}} \cdot \gamma_{0,14}}{\text{Akt}^{n_{0,14}} + S_{0,14}^{n_{0,14}}} + \frac{S_{0,14}^{n_{0,14}}}{\text{Akt}^{n_{0,14}} + S_{0,14}^{n_{0,14}}} \right) \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,14}} \cdot \gamma_{3,14}}{\text{HIF}^{n_{3,14}} + S_{3,14}^{n_{3,14}}} + \frac{S_{3,14}^{n_{3,14}}}{\text{HIF}^{n_{3,14}} + S_{3,14}^{n_{3,14}}} \right) - D_{14} \cdot \text{HK}$$

$$\frac{dG6PD}{dt} = A_{15} \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,15}} \cdot \gamma_{3,15}}{\text{HIF}^{n_{3,15}} + S_{3,15}^{n_{3,15}}} + \frac{S_{3,15}^{n_{3,15}}}{\text{HIF}^{n_{3,15}} + S_{3,15}^{n_{3,15}}} \right) \cdot \left(\frac{\text{p53}^{n_{6,15}} \cdot \gamma_{6,15}}{\text{p53}^{n_{6,15}} + S_{6,15}^{n_{6,15}}} + \frac{S_{6,15}^{n_{6,15}}}{\text{p53}^{n_{6,15}} + S_{6,15}^{n_{6,15}}} \right) - D_{15} \cdot \text{G6PD}$$

$$\frac{dGPI}{dt} = A_{16} \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,16}} \cdot \gamma_{3,16}}{\text{HIF}^{n_{3,16}} + S_{3,16}^{n_{3,16}}} + \frac{S_{3,16}^{n_{3,16}}}{\text{HIF}^{n_{3,16}} + S_{3,16}^{n_{3,16}}} \right) - D_{16} \cdot \text{GPI}$$

$$\begin{aligned} \frac{dPFKFB2}{dt} = A_{17} \cdot & \left(\frac{\text{Akt}^{n_{0,17}} \cdot \gamma_{0,17}}{\text{Akt}^{n_{0,17}} + S_{0,17}^{n_{0,17}}} + \frac{S_{0,17}^{n_{0,17}}}{\text{Akt}^{n_{0,17}} + S_{0,17}^{n_{0,17}}} \right) \cdot \left(\frac{\text{AMPK}^{n_{1,17}} \cdot \gamma_{1,17}}{\text{AMPK}^{n_{1,17}} + S_{1,17}^{n_{1,17}}} + \frac{S_{1,17}^{n_{1,17}}}{\text{AMPK}^{n_{1,17}} + S_{1,17}^{n_{1,17}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,17}} \cdot \gamma_{3,17}}{\text{HIF}^{n_{3,17}} + S_{3,17}^{n_{3,17}}} + \frac{S_{3,17}^{n_{3,17}}}{\text{HIF}^{n_{3,17}} + S_{3,17}^{n_{3,17}}} \right) - D_{17} \cdot \text{PFKFB2} \end{aligned}$$

$$\frac{dPFK1}{dt} = A_{18} \cdot \left(\frac{\text{RAS}^{n_{10,18}} \cdot \gamma_{10,18}}{\text{RAS}^{n_{10,18}} + S_{10,18}^{n_{10,18}}} + \frac{S_{10,18}^{n_{10,18}}}{\text{RAS}^{n_{10,18}} + S_{10,18}^{n_{10,18}}} \right) \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,18}} \cdot \gamma_{3,18}}{\text{HIF}^{n_{3,18}} + S_{3,18}^{n_{3,18}}} + \frac{S_{3,18}^{n_{3,18}}}{\text{HIF}^{n_{3,18}} + S_{3,18}^{n_{3,18}}} \right) - D_{18} \cdot \text{PFK1}$$

$$\frac{dALD}{dt} = A_{19} \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,19}} \cdot \gamma_{3,19}}{\text{HIF}^{n_{3,19}} + S_{3,19}^{n_{3,19}}} + \frac{S_{3,19}^{n_{3,19}}}{\text{HIF}^{n_{3,19}} + S_{3,19}^{n_{3,19}}} \right) - D_{19} \cdot \text{ALD}$$

$$\frac{dTPI}{dt} = A_{20} \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,20}} \cdot \gamma_{3,20}}{\text{HIF}^{n_{3,20}} + S_{3,20}^{n_{3,20}}} + \frac{S_{3,20}^{n_{3,20}}}{\text{HIF}^{n_{3,20}} + S_{3,20}^{n_{3,20}}} \right) - D_{20} \cdot \text{TPI}$$

$$\frac{dGAPDH}{dt} = A_{21} \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,21}} \cdot \gamma_{3,21}}{\text{HIF}^{n_{3,21}} + S_{3,21}^{n_{3,21}}} + \frac{S_{3,21}^{n_{3,21}}}{\text{HIF}^{n_{3,21}} + S_{3,21}^{n_{3,21}}} \right) - D_{21} \cdot \text{GAPDH}$$

$$\frac{d\text{PGK}}{dt} = A_{22} \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,22}} \cdot \gamma_{3,22}}{\text{HIF}^{n_{3,22}} + S_{3,22}^{n_{3,22}}} + \frac{S_{3,22}^{n_{3,22}}}{\text{HIF}^{n_{3,22}} + S_{3,22}^{n_{3,22}}} \right) - D_{22} \cdot \text{PGK}$$

$$\frac{d\text{PHGDH}}{dt} = A_{23} - D_{23} \cdot \text{PHGDH}$$

$$\frac{d\text{PGAM}}{dt} = A_{24} \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,24}} \cdot \gamma_{3,24}}{\text{HIF}^{n_{3,24}} + S_{3,24}^{n_{3,24}}} + \frac{S_{3,24}^{n_{3,24}}}{\text{HIF}^{n_{3,24}} + S_{3,24}^{n_{3,24}}} \right) - D_{24} \cdot \text{PGAM}$$

$$\frac{d\text{ENO}}{dt} = A_{25} \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,25}} \cdot \gamma_{3,25}}{\text{HIF}^{n_{3,25}} + S_{3,25}^{n_{3,25}}} + \frac{S_{3,25}^{n_{3,25}}}{\text{HIF}^{n_{3,25}} + S_{3,25}^{n_{3,25}}} \right) - D_{25} \cdot \text{ENO}$$

$$\frac{d\text{PKM2}}{dt} = A_{26} \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,26}} \cdot \gamma_{3,26}}{\text{HIF}^{n_{3,26}} + S_{3,26}^{n_{3,26}}} + \frac{S_{3,26}^{n_{3,26}}}{\text{HIF}^{n_{3,26}} + S_{3,26}^{n_{3,26}}} \right) - D_{26} \cdot \text{PKM2}$$

$$\frac{d\text{PDH}}{dt} = A_{27} \cdot \left(\frac{\text{PDK}^{n_{7,27}} \cdot \gamma_{7,27}}{\text{PDK}^{n_{7,27}} + S_{7,27}^{n_{7,27}}} + \frac{S_{7,27}^{n_{7,27}}}{\text{PDK}^{n_{7,27}} + S_{7,27}^{n_{7,27}}} \right) \cdot \left(\frac{\text{PTEN}^{n_{9,27}} \cdot \gamma_{9,27}}{\text{PTEN}^{n_{9,27}} + S_{9,27}^{n_{9,27}}} + \frac{S_{9,27}^{n_{9,27}}}{\text{PTEN}^{n_{9,27}} + S_{9,27}^{n_{9,27}}} \right) - D_{27} \cdot \text{PDH}$$

$$\begin{aligned} \frac{d\text{ACC}}{dt} = & A_{28} \cdot \left(\frac{\text{AMPK}^{n_{1,28}} \cdot \gamma_{1,28}}{\text{AMPK}^{n_{1,28}} + S_{1,28}^{n_{1,28}}} + \frac{S_{1,28}^{n_{1,28}}}{\text{AMPK}^{n_{1,28}} + S_{1,28}^{n_{1,28}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{(\text{G6P}/\text{Lx}_{31})^{n_{31,28}} \cdot \gamma_{31,28}}{(\text{G6P}/\text{Lx}_{31})^{n_{31,28}} + S_{31,28}^{n_{31,28}}} + \frac{S_{31,28}^{n_{31,28}}}{(\text{G6P}/\text{Lx}_{31})^{n_{31,28}} + S_{31,28}^{n_{31,28}}} \right) \\ & \cdot \left(\frac{(\text{F26BP}/\text{Lx}_{43})^{n_{43,28}} \cdot \gamma_{43,28}}{(\text{F26BP}/\text{Lx}_{43})^{n_{43,28}} + S_{43,28}^{n_{43,28}}} + \frac{S_{43,28}^{n_{43,28}}}{(\text{F26BP}/\text{Lx}_{43})^{n_{43,28}} + S_{43,28}^{n_{43,28}}} \right) - D_{28} \cdot \text{ACC} \end{aligned}$$

$$\frac{d\text{LDH}}{dt} = A_{29} \cdot \left(\frac{\text{cMyc}^{n_{2,29}} \cdot \gamma_{2,29}}{\text{cMyc}^{n_{2,29}} + S_{2,29}^{n_{2,29}}} + \frac{S_{2,29}^{n_{2,29}}}{\text{cMyc}^{n_{2,29}} + S_{2,29}^{n_{2,29}}} \right) \cdot \left(\frac{\text{HIF}^{n_{3,29}} \cdot \gamma_{3,29}}{\text{HIF}^{n_{3,29}} + S_{3,29}^{n_{3,29}}} + \frac{S_{3,29}^{n_{3,29}}}{\text{HIF}^{n_{3,29}} + S_{3,29}^{n_{3,29}}} \right) - D_{29} \cdot \text{LDH}$$

$$\frac{d\text{Glucose}}{dt} = r_1 - r_2$$

$$\frac{d\text{G6P}}{dt} = -r_{13} + r_2 - r_3$$

$$\frac{d\text{F6P}}{dt} = -r_{16} + 2 \cdot r_{22} + r_3 - r_4$$

$$\frac{d\text{FBP}}{dt} = r_4 - r_5$$

$$\frac{d\text{G3P}}{dt} = r_{22} + r_5 + r_6 - r_7$$

$$\frac{d\text{DHAP}}{dt} = r_5 - r_6$$

$$\frac{d\text{13BPG}}{dt} = r_7 - r_8$$

$$\frac{d\text{3PG}}{dt} = -r_{17} + r_8 - r_9$$

$$\frac{d\text{2PG}}{dt} = -r_{10} + r_9$$

$$\frac{d\text{PEP}}{dt} = r_{10} - r_{11}$$

$$\frac{d\text{Pyruvate}}{dt} = r_{11} - r_{12} - r_{18}$$

$$\frac{d\text{Lactate}}{dt} = r_{12} - r_{21}$$

$$\frac{dR5P}{dt} = r_{13} - 3 \cdot r_{22} - r_{23}$$

$$\frac{dF26BP}{dt} = r_{16}$$

$$\frac{dSerine}{dt} = r_{17} - r_{24}$$

$$\frac{dCitrate}{dt} = r_{18} - r_{19} - r_{26} - r_{30}$$

$$\frac{dAMP}{dt} = -r_{15}$$

$$\frac{dADP}{dt} = -r_{11} + r_{14} + 2 \cdot r_{15} - r_{18} + 3 \cdot r_{19} + r_2 - r_{25} - 3 \cdot r_{26} - 1,5 \cdot r_{27} + r_4 - r_8$$

$$\frac{dATP}{dt} = r_{11} - r_{14} - r_{15} + r_{18} - 3 \cdot r_{19} - r_2 + r_{25} + 3 \cdot r_{26} + 1,5 \cdot r_{27} - r_4 + r_8$$

$$\frac{dNAD}{dt} = r_{12} + r_{25} - r_7$$

$$\frac{dNADH}{dt} = -r_{12} - r_{25} + r_7$$

$$\frac{dcomplex2}{dt} = r_{18} - r_{19} + r_{25} + 4 \cdot r_{26} - r_{27} - r_{28}$$

$$\frac{dROS}{dt} = -r_{20} + r_{28} + r_{29}$$

$$\frac{dH_{out}^+}{dt} = \frac{r_{21}}{1000 \cdot \left(-\frac{Ka_{lac} \cdot Lactate_{out}}{1000 \cdot (H_{out} + Ka_{lac})^2} + 1 + \frac{Ka_{water}}{H_{out}^2} \right)}$$

$$\frac{dO_2}{dt} = 0.226 \cdot 2.3 \cdot r_{27}$$

$$r1 = \frac{V_{mf1} \cdot GluT1 \cdot \left(Glu_{out} - \frac{Glucose}{K_{eq1}} \right)}{Glu_{out} + K_{gluout1} \cdot \left(1 + \frac{Glucose}{K_{gluin1}} \right)}$$

$$r2 = \frac{V_{m2} \cdot pH_{inhibition} \cdot HK \cdot \left(Glucose \cdot ATP - \frac{G6P}{K_{eq2}} \cdot ADP \right)}{K_{a2} \cdot K_{b2} \cdot \left(1 + \frac{ADP}{K_{q2}} + \frac{G6P}{K_{p2}} + \frac{G6P \cdot ADP}{K_{p2} \cdot K_{q2}} + \frac{ATP}{K_{b2}} + \frac{G6P \cdot ATP}{K_{b2} \cdot K_{p2}} + \frac{Glucose}{K_{a2}} + \frac{Glucose \cdot ADP}{K_{a2} \cdot K_{q2}} + \frac{Glucose \cdot ATP}{K_{a2} \cdot K_{b2}} \right)}$$

$$r3 = \frac{pH_{inhibition} \cdot \left(\frac{V_{mf3}}{K_{g6p3}} \cdot GPI \cdot G6P - \frac{V_{mr3}}{K_{f6p3}} \cdot GPI \cdot F6P \right)}{\frac{Ery4P}{K_{ery4p3}} + 1 + \frac{bx6PG}{K_{pg3}} + \frac{G6P}{K_{g6p3}} + \frac{FBP}{K_{fbp3}} + \frac{F6P}{K_{f6p3}}}$$

r4

$$= \frac{V_{m_4} \cdot pH_{inhibition} \cdot PFK1 \cdot F6P}{K_{atp_4} \cdot \left(1 + \frac{F6P}{K_{atp_4}}\right) \cdot \left(1 + \frac{F26BP}{K_{f26bp_4} \cdot \alpha_4}\right)} \cdot \left(1 + \frac{\beta_4 \cdot F26BP}{K_{f26bp_4} \cdot \alpha_4}\right)$$

$$\cdot \left(\frac{\text{ATP} \cdot \left(1 + \frac{F26BP}{K_{f26bp_4} \cdot \alpha_4}\right) \cdot \left(1 + \frac{\text{ATP} \cdot \left(1 + \frac{F26BP}{K_{f26bp_4} \cdot \alpha_4}\right)}{K_{f6p_4} \cdot \left(1 + \frac{F26BP}{K_{f26bp_4}}\right)}\right)^3}{K_{f6p_4} \cdot \left(1 + \frac{F26BP}{K_{f26bp_4}}\right) \cdot \left(\frac{L_4 \cdot \left(\frac{Citrate}{K_{cit_4}} + 1\right)^4}{\left(1 + \frac{F26BP}{K_{f26bp_4}}\right)^4} \cdot \left(1 + \frac{F6P}{K_{iatp_4}}\right)^4 + \left(1 + \frac{\text{ATP} \cdot \left(1 + \frac{F26BP}{K_{f26bp_4} \cdot \alpha_4}\right)}{K_{f6p_4} \cdot \left(1 + \frac{F26BP}{K_{f26bp_4}}\right)}\right)^4}\right)^4 \right)$$

$$- \frac{FBP \cdot ADP}{K_{adp_4} \cdot K_{eq_4} \cdot K_{fbp_4} \cdot \left(1 + \frac{ADP}{K_{fbp_4}} + \frac{FBP}{K_{adp_4}} + \frac{FBP \cdot ADP}{K_{adp_4} \cdot K_{fbp_4}}\right)}$$

$$r5 = \frac{pH_{inhibition} \cdot \left(\frac{V_{mf_5}}{K_{fbp_5}} \cdot \text{ALD} \cdot \text{FBP} - \frac{V_{mr_5}}{K_{dhap_5} \cdot K_{g3p_5}} \cdot \text{ALD} \cdot \text{G3P} \cdot \text{DHAP}\right)}{1 + \frac{\text{G3P}}{K_{g3p_5}} + \frac{\text{FBP}}{K_{fbp_5}} + \frac{\text{DHAP}}{K_{dhap_5}} + \frac{\text{G3P} \cdot \text{DHAP}}{K_{dhap_5} \cdot K_{g3p_5}}}$$

$$r6 = pH_{inhibition} \cdot \left(V_{f_6} \cdot \text{TPI} \cdot \text{DHAP} - \frac{V_{r_6} \cdot \text{TPI} \cdot \text{G3P}}{K_{mp_6} \cdot K_{ms_6} + K_{mp_6} \cdot \text{DHAP} + K_{ms_6} \cdot \text{G3P}}\right)$$

$$r7 = \frac{pH_{inhibition} \cdot \left(\frac{Pi \cdot V_{mf7} \cdot GAPDH \cdot G3P \cdot NAD}{K_{g3p7} \cdot K_{nad7} \cdot K_{p7}} - \frac{V_{mr7} \cdot GAPDH \cdot 13BPG}{K_{dpg7} \cdot K_{nadh7}} \cdot NADH \right)}{1 + \frac{NADH}{K_{nadh7}} + \frac{NAD}{K_{nad7}} + \frac{G3P \cdot NAD}{K_{g3p7} \cdot K_{nad7}} + \frac{Pi \cdot G3P \cdot NAD}{K_{g3p7} \cdot K_{nad7} \cdot K_{p7}} + \frac{13BPG \cdot NADH}{K_{dpg7} \cdot K_{nadh7}}}$$

$$r8 = \frac{-\frac{V_{mr8} \cdot PGK \cdot 3PG \cdot ATP}{K_{p8} \cdot K_{q8} \cdot \beta_8} + \frac{V_{mf8} \cdot PGK \cdot 13BPG \cdot ADP}{K_{a8} \cdot K_{b8} \cdot \alpha_8}}{1 + \frac{ATP}{K_{q8}} + \frac{3PG}{K_{p8}} + \frac{3PG \cdot ATP}{K_{p8} \cdot K_{q8} \cdot \beta_8} + \frac{ADP}{K_{b8}} + \frac{13BPG}{K_{a8}} + \frac{13BPG \cdot ADP}{K_{a8} \cdot K_{b8} \cdot \alpha_8}}$$

$$r9 = V_{f9} \cdot PGAM \cdot 3PG - \frac{V_{r9} \cdot PGAM \cdot 2PG}{K_{mp9} \cdot K_{ms9} + K_{mp9} \cdot 3PG + K_{ms9} \cdot 2PG}$$

$$r10 = pH_{inhibition} \cdot \left(V_{f10} \cdot ENO \cdot 2PG - \frac{V_{r10} \cdot ENO \cdot PEP}{K_{mp10} \cdot K_{ms10} + K_{mp10} \cdot 2PG + K_{ms10} \cdot PEP} \right)$$

$$r11 = \frac{V_{max11} \cdot pH_{inhibition} \cdot PKM2 \cdot \left(\frac{PEP \cdot ADP}{K_{adp11} \cdot K_{pep11}} - \frac{Pyruvate \cdot ATP}{K_{adp11} \cdot K_{eq11} \cdot K_{pep11}} \right)}{\left(1 + \frac{ATP}{K_{atp11}} + \frac{ADP}{K_{adp11}} \right) \cdot \left(1 + \frac{Pyruvate}{K_{pyr11}} + \frac{PEP}{K_{pep11}} \right)}$$

$$r12 = \frac{-\frac{V_{mr12} \cdot LDH \cdot Lactate \cdot NAD}{K_{p12} \cdot K_{q12} \cdot \beta_{12}} + \frac{V_{mf12} \cdot LDH \cdot Pyruvate \cdot NADH}{K_{a12} \cdot K_{b12} \cdot \alpha_{12}}}{1 + \frac{NAD}{K_{q12}} + \frac{Lactate}{K_{p12}} + \frac{Lactate \cdot NAD}{K_{p12} \cdot K_{q12} \cdot \beta_{12}} + \frac{Pyruvate}{K_{b12}} + \frac{NADH}{K_{a12}} + \frac{Pyruvate \cdot NADH}{K_{a12} \cdot K_{b12} \cdot \alpha_{12}}}$$

$$r13 = \frac{V_{m13} \cdot pH_{inhibition} \cdot G6PD}{K_{m13} + G6P} \cdot G6P$$

$$r14 = k_{14} \cdot ATP$$

$$r15 = k_{15} \cdot AMP \cdot ATP - k_{25} \cdot ADP^2$$

$$r16 = pH_{inhibition} \cdot \left(V_{f16} \cdot \text{PFKFB2} \cdot \text{F6P} - \frac{V_{r16} \cdot \text{PFKFB2} \cdot \text{F26BP}}{K_{mp16} \cdot K_{ms16} + K_{mp16} \cdot \text{F6P} + K_{ms16} \cdot \text{F26BP}} \right)$$

$$r17 = \frac{V_{m17} \cdot \text{PHGDH} \cdot \text{3PG}}{K_{m17} + \text{3PG}}$$

$$r18 = \frac{O_2 \cdot V_{m18} \cdot \text{PDH} \cdot \text{Pyruvate}}{(K_{m18} + \text{Pyruvate}) \cdot (O_2 + 0,011)}$$

$$r19 = \frac{V_{m19} \cdot \text{ACC} \cdot \text{Citrate}}{K_{m19} + \text{Citrate}}$$

$$r20 = \frac{V_{m20} \cdot \text{SOD} \cdot \text{ROS}}{K_{m20} + \text{ROS}}$$

$$r21 = V_{mf21} \cdot (r21_{forward} - r21_{reverse})$$

$$r21_{forward} = \frac{1}{e^{2 \cdot (\text{Lactate}_{out} - \text{Lactate})} + 1} \cdot \frac{\text{Lactate}}{\text{Lactate} + 0.01} \cdot \text{Regulation}_{lac/pyr}$$

$$r21_{reverse} = 0.2 \cdot \left(1 - \frac{1}{e^{2 \cdot (\text{Lactate}_{out} - \text{Lactate})} + 1} \right) \cdot \frac{\text{Lactate}_{out}}{\text{Lactate}_{out} + 0.1} \cdot \text{Regulation}_{pHe/pHi}$$

$$\text{Regulation}_{lac/pyr} = \frac{1}{1 + \frac{1}{\left(e^{\text{Ratio}_{lac/pyr} - 10} \right)^2}} \cdot \frac{1}{e^{150 \cdot (0.1 - \text{Pyruvate})} + 1}$$

$$\text{Ratio}_{lac/pyr} = \frac{\text{Lactate} + 0.001}{\text{Pyruvate} + 0.001}$$

$$\text{Regulation}_{pH_e/pH_i} = 1 - \frac{1}{e^{-2 \cdot \left(\frac{pH_i}{pH_{eq}} \right)} + 1}$$

$$r_{22} = k_{1_{22}} \cdot R5P^3 - k_{2_{22}} \cdot F6P^2 \cdot G3P$$

$$r_{23} = k_{23} \cdot pH_{inhibition} \cdot R5P$$

$$r_{24} = k_{24} \cdot \text{Serine}$$

$$r_{25} = \frac{O_2 \cdot k_{25} \cdot \text{NADH}}{O_2 + 0,011}$$

$$r_{26} = k_{26} \cdot \text{Citrate}$$

$$r_{27} = k_{27} \cdot \text{complex2}$$

$$r_{28} = O_2 \cdot k_{28} \cdot \text{complex2}$$

$$r_{29} = \frac{O_2 \cdot V_{m_{29}} \cdot \text{NOX}}{K_{m_{29}} + O_2}$$

$$r_{30} = k_{30} \cdot \text{Citrate}$$

$$pH_{inhibition} = 0.1 + \frac{0.9}{e^{\frac{6.7 - pH_e}{0.12}} + 1.0}$$

Bibliographie

Voici les différentes références dans l'ordre de citation.

- [1] Ralph J. DEBERARDINIS et Navdeep S. CHANDEL. « Fundamentals of cancer metabolism ». In : *Science Advances* 2.5 (2016). DOI : [10.1126/sciadv.1600200](https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200) (cité page 1).
- [2] Slobodan DEVIC. « Warburg effect - a consequence or the cause of carcinogenesis? » In : *Journal of Cancer* 7.7 (2016), p. 817-822. DOI : [10.7150/jca.14274](https://doi.org/10.7150/jca.14274) (cité page 1).
- [3] Paik Jayadeva BHAT et al. « Can metabolic plasticity be a cause for cancer? Warburg-Waddington legacy revisited ». In : *Clinical Epigenetics* 2.2 (août 2011), p. 113-122. DOI : [10.1007/s13148-011-0030-x](https://doi.org/10.1007/s13148-011-0030-x) (cité page 1).
- [4] Johannes H. G. M. van BEEK. « The dynamic side of the Warburg effect : glycolytic intermediate storage as buffer for fluctuating glucose and O₂ supply in tumor cells ». In : *F1000Research* 7.0 (2018), p. 1177. DOI : [10.12688/f1000research.15635.2](https://doi.org/10.12688/f1000research.15635.2) (cité page 1).
- [5] Shona A. MOOKERJEE et al. « Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements ». In : *Journal of Biological Chemistry* 292.17 (2017), p. 7189-7207. DOI : [10.1074/jbc.M116.774471](https://doi.org/10.1074/jbc.M116.774471) (cité page 1).
- [6] Alexei VAZQUEZ et al. « Catabolic efficiency of aerobic glycolysis : The Warburg effect revisited ». In : *BMC Systems Biology* 4.1 (déc. 2010), p. 58. DOI : [10.1186/1752-0509-4-58](https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-58) (cité page 1).
- [7] Scott K. PARKS, Wolfgang MUELLER-KLIESER et Jacques POUYSSÉGUR. « Lactate and Acidity in the Cancer Microenvironment ». In : *Annual Review of Cancer Biology* 4.1 (2020), p. 141-158. DOI : [10.1146/annurev-cancerbio-030419-033556](https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030419-033556) (cité page 1).
- [8] Maria V. LIBERTI et al. « The Warburg Effect : How Does it Benefit Cancer Cells? » In : *Trends in Biochemical Sciences* 41.3 (mars 2016), p. 211-218. DOI : [10.1016/j.tibs.2015.12.001](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001) (cité page 1).
- [9] Robert A. GATENBY et Robert J. GILLIES. « Why do cancers have high aerobic glycolysis? » In : *Nature Reviews Cancer* 4.11 (2004), p. 891-899. DOI : [10.1038/nrc1478](https://doi.org/10.1038/nrc1478) (cité page 1).
- [10] R. J. GILLIES, I. ROBAY et R. A. GATENBY. « Causes and Consequences of Increased Glucose Metabolism of Cancers ». In : *Journal of Nuclear Medicine* 49.Suppl_2 (juin 2008), p. 24-42. DOI : [10.2967/jnumed.107.047258](https://doi.org/10.2967/jnumed.107.047258) (cité page 1).
- [11] Géraldine GENTRIC, Virginie MIEULET et Fatima MECHTA-GRIGORIOU. « Heterogeneity in Cancer Metabolism : New Concepts in an Old Field ». In : *Antioxidants and Redox Signaling* 26.9 (2017), p. 462-485. DOI : [10.1089/ars.2016.6750](https://doi.org/10.1089/ars.2016.6750) (cité page 1).
- [12] Edward R. TUFTE. *The Visual Display of Quantitative Information*. 2^e éd. Graphics Press, 2001 (cité page 3).
- [13] M. MARTINEAUD et J. TRÉMOLIÈRES. « Mesure de la perspiration insensible et des températures cutanées chez l'obèse dans les conditions basales ». In : *Nutritio et dieta* 6.2 (1964), p. 86-90 (cité page 5).

- [14] Miguel Ángel MEDINA. « Metabolic Reprogramming is a Hallmark of Metabolism Itself ». In : *BioEssays* 42.10 (oct. 2020), p. 2000058. DOI : [10.1002/bies.202000058](https://doi.org/10.1002/bies.202000058) (cité aux pages 6, 16, 38, 40, 127).
- [15] Donald NICHOLSON. « From metabolic pathways charts to animaps in 50 years ». In : *Biochemistry and Molecular Biology Education* 33.3 (2005), p. 156-158. DOI : <https://doi.org/10.1002/bmb.2005.494033032480> (cité page 6).
- [16] *Reactome reaction database*. URL : <https://reactome.org/content/query?q=%2A&species=Homo%2Bsapiens&types=Reaction&cluster=true> (visité le 02/03/2022) (cité page 6).
- [17] P. R. RICH. « The molecular machinery of Keilin's respiratory chain ». In : *Biochemical Society Transactions* 31.6 (déc. 2003), p. 1095-1105. DOI : [10.1042/bst0311095](https://doi.org/10.1042/bst0311095) (cité page 8).
- [18] Peter C. HINKLE. « P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1706.1-2 (jan. 2005), p. 1-11. DOI : [10.1016/j.bbabi.2004.09.004](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.09.004) (cité page 8).
- [19] Xavier LEVERVE, Cécile BATANDIER et Eric FONTAINE. « Choosing the right substrate. » In : *Novartis Foundation symposium* 280 (2007), 108-21, discussion 121-7, 160-4. ppublish (cité page 9).
- [20] Peter SCHÖNFELD et Georg REISER. « Why does Brain Metabolism not Favor Burning of Fatty Acids to Provide Energy? - Reflections on Disadvantages of the Use of Free Fatty Acids as Fuel for Brain ». In : *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 33.10 (août 2013), p. 1493-1499. DOI : [10.1038/jcbfm.2013.128](https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.128) (cité page 9).
- [21] Wanding ZHOU et Luay NAKHLEH. « Properties of metabolic graphs : biological organization or representation artifacts? » In : *BMC Bioinformatics* 12.1 (2011). DOI : [10.1186/1471-2105-12-132](https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-132) (cité page 9).
- [22] Mariano BEGUERISSE-DÍAZ et al. « Flux-dependent graphs for metabolic networks ». In : *npj Systems Biology and Applications* 4.1 (2018). DOI : [10.1038/s41540-018-0067-y](https://doi.org/10.1038/s41540-018-0067-y) (cité page 9).
- [23] Abdelhalim LARHLIMI et al. « Robustness of metabolic networks : A review of existing definitions ». In : *Biosystems* 106.1 (oct. 2011), p. 1-8. DOI : [10.1016/j.biosystems.2011.06.002](https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2011.06.002) (cité aux pages 10, 15).
- [24] Ron CASPI, Kate DREHER et Peter D. KARP. « The challenge of constructing, classifying, and representing metabolic pathways ». In : *FEMS Microbiology Letters* 345.2 (juin 2013), p. 85-93. DOI : [10.1111/1574-6968.12194](https://doi.org/10.1111/1574-6968.12194) (cité page 10).
- [25] Caroline JOSE, Nadège BELLANCE et Rodrigue ROSSIGNOL. « Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation : A tumor's dilemma? » In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807.6 (juin 2011), p. 552-561. DOI : [10.1016/j.bbabi.2010.10.012](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.012) (cité page 10).
- [26] Jie ZHENG. « Energy metabolism of cancer : Glycolysis versus oxidative phosphorylation (review) ». In : *Oncology Letters* 4.6 (déc. 2012), p. 1151-1157. DOI : [10.3892/ol.2012.928](https://doi.org/10.3892/ol.2012.928) (cité page 10).
- [27] Hirak S. BASU et al. « Metabolic switch from glycolysis to oxidative phosphorylation (ox-phos) provides survival advantage to anti-androgen-treated prostate cancer cells and make them vulnerable to mitochondrial metabolism inhibitors IACS-010759 and CB-839 ». In : *Molecular and Cellular Biology / Genetics*. American Association for Cancer Research, août 2020. DOI : [10.1158/1538-7445.am2020-4791](https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2020-4791) (cité page 10).

- [28] M. OSTROUKHOVA et al. « Switching of Glucose Metabolism from Oxidative Phosphorylation to Aerobic Glycolysis (the Warburg Effect) in T-Cells from Patients with Asthma ». In : *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125.2 (2010), AB39. DOI : [10.1016/j.jaci.2009.12.187](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.187) (cité page 10).
- [29] Douglas HANAHAN et Robert A. WEINBERG. « The Hallmarks of Cancer ». In : *Cell* 100.1 (jan. 2000), p. 57-70. DOI : [10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9) (cité aux pages 11, 15, 21).
- [30] Douglas HANAHAN et Robert A. WEINBERG. « Hallmarks of cancer : The next generation ». In : *Cell* 144.5 (2011), p. 646-674. DOI : [10.1016/j.cell.2011.02.013](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013) (cité page 11).
- [31] WIKIPEDIA. *The Hallmarks of Cancer* — Wikipedia, The Free Encyclopedia. <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=The%20Hallmarks%20of%20Cancer&oldid=1069282740>. [Online; accessed 07-March-2022]. 2022. URL : <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=The%5C%20Hallmarks%5C%20of%5C%20Cancer&oldid=1069282740> (cité page 11).
- [32] Georgia MEIMON. *Culture de cellules animales*. Paris : Lavoisier-Tec & Doc, 2014 (cité page 12).
- [33] R. A. GREENBERG. « Telomeres, crisis and cancer. » In : *Current molecular medicine* 5 (2 mars 2005), p. 213-218. DOI : [10.2174/1566524053586590](https://doi.org/10.2174/1566524053586590). ppublish (cité page 12).
- [34] A. STÉPHANOÛ et al. « How tumour-induced vascular changes alter angiogenesis : Insights from a computational model ». In : *Journal of Theoretical Biology* 419 (2017), p. 211-226. DOI : [10.1016/j.jtbi.2017.02.018](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.02.018) (cité page 12).
- [35] M. E. PETER et al. « The role of CD95 and CD95 ligand in cancer ». In : *Cell Death & Differentiation* 22.4 (2015), p. 549-559. DOI : [10.1038/cdd.2015.3](https://doi.org/10.1038/cdd.2015.3) (cité page 12).
- [36] Veronica HUBER et al. « Cancer acidity : An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation ». In : *Seminars in Cancer Biology* 43 (2017), p. 74-89. DOI : [10.1016/j.semcan.2017.03.001](https://doi.org/10.1016/j.semcan.2017.03.001) (cité page 12).
- [37] Nitin SINGH et al. « Inflammation and cancer ». In : *Annals of African Medicine* 18.3 (2019), p. 121. DOI : [10.4103/aam.aam_56_18](https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18) (cité page 12).
- [38] Gaoyang ZHU et al. « Mutant p53 in Cancer Progression and Targeted Therapies ». In : *Frontiers in Oncology* 10 (2020). DOI : [10.3389/fonc.2020.595187](https://doi.org/10.3389/fonc.2020.595187) (cité page 13).
- [39] Gaurav MENDIRATTA et al. « Cancer gene mutation frequencies for the U.S. population. » In : *Nature communications* 12 (1 oct. 2021), p. 5961. DOI : [10.1038/s41467-021-26213-y](https://doi.org/10.1038/s41467-021-26213-y). epublish (cité page 13).
- [40] Jiandong CHEN. « The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression ». In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6.3 (2016), a026104. DOI : [10.1101/cshperspect.a026104](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026104) (cité page 13).
- [41] Wasim FERAZ et Arwah Mohammad Ali SHEIKH. « Exploring the multiple roles of guardian of the genome : P53 ». In : *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 21.1 (2020). DOI : [10.1186/s43042-020-00089-x](https://doi.org/10.1186/s43042-020-00089-x) (cité page 13).
- [42] M. OLIVIER, M. HOLLSTEIN et P. HAINAUT. « TP53 Mutations in Human Cancers : Origins, Consequences, and Clinical Use ». In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2.1 (2009), a001008-a001008. DOI : [10.1101/cshperspect.a001008](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001008) (cité page 13).
- [43] Moritz GERSTUNG et al. « The evolutionary history of 2,658 cancers ». In : *Nature* 578.7793 (2020), p. 122-128. DOI : [10.1038/s41586-019-1907-7](https://doi.org/10.1038/s41586-019-1907-7) (cité page 14).

- [44] Daniel KREWSKI et al. « Key characteristics of 86 agents known to cause cancer in humans ». In : *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 22.7-8 (2019), p. 244-263. DOI : [10.1080/10937404.2019.1643536](https://doi.org/10.1080/10937404.2019.1643536) (cité page 14).
- [45] Louis JACOB et al. « Impact of tobacco smoking on the risk of developing 25 different cancers in the UK : a retrospective study of 422,010 patients followed for up to 30 years ». In : *Oncotarget* 9.25 (2018), p. 17420-17429. DOI : [10.18632/oncotarget.24724](https://doi.org/10.18632/oncotarget.24724) (cité page 14).
- [46] G. POSCHL. « Alcohol and Cancer ». In : *Alcohol and Alcoholism* 39.3 (2004), p. 155-165. DOI : [10.1093/alcalc/agh057](https://doi.org/10.1093/alcalc/agh057) (cité page 14).
- [47] Vincent L. CANNATARO, Jeffrey D. MANDELL et Jeffrey P. TOWNSEND. « Attribution of Cancer Origins to Endogenous, Exogenous, and Preventable Mutational Processes ». In : *Molecular Biology and Evolution* 39.5 (2022). Sous la dir. de Melissa WILSON. DOI : [10.1093/molbev/msac084](https://doi.org/10.1093/molbev/msac084) (cité page 14).
- [48] Paul W. EWALD et Holly A. Swain EWALD. « Infection, mutation, and cancer evolution ». In : *Journal of Molecular Medicine* 90.5 (2012), p. 535-541. DOI : [10.1007/s00109-012-0891-2](https://doi.org/10.1007/s00109-012-0891-2) (cité page 14).
- [49] Yehudit HASIN, Marcus SELDIN et Aldons LUSIS. « Multi-omics approaches to disease ». In : *Genome Biology* 18.1 (2017). DOI : [10.1186/s13059-017-1215-1](https://doi.org/10.1186/s13059-017-1215-1) (cité page 15).
- [50] Indhupriya SUBRAMANIAN et al. « Multi-omics Data Integration, Interpretation, and Its Application ». In : *Bioinformatics and Biology Insights* 14 (2020), p. 117793221989905. DOI : [10.1177/1177932219899051](https://doi.org/10.1177/1177932219899051) (cité page 15).
- [51] Michelle POTTER, Emma NEWPORT et Karl J. MORTEN. « The Warburg effect : 80 years on ». In : *Biochemical Society Transactions* 44.5 (2016), p. 1499-1505. DOI : [10.1042/bst20160094](https://doi.org/10.1042/bst20160094) (cité page 16).
- [52] Otto WARBURG. « On the Origin of Cancer Cells ». In : *Science* 123.3191 (fév. 1956), p. 309-314. DOI : [10.1126/science.123.3191.309](https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309) (cité aux pages 16, 17, 25, 27, 28).
- [53] Deniz SENYILMAZ et Aurelio A. TELEMAN. « Chicken or the egg : Warburg effect and mitochondrial dysfunction ». In : *F1000Prime Reports* 7 (2015). DOI : [10.12703/p7-41](https://doi.org/10.12703/p7-41) (cité page 16).
- [54] Jiansheng XIE et al. « Beyond Warburg effect - Dual metabolic nature of cancer cells ». In : *Scientific Reports* 4 (2014), p. 1-12. DOI : [10.1038/srep04927](https://doi.org/10.1038/srep04927) (cité aux pages 16, 17, 21, 55, 57, 68, 70, 72, 93, 126).
- [55] Christian FREZZA. « Metabolism and cancer : the future is now ». In : *British Journal of Cancer* 122.2 (jan. 2020), p. 133-135. DOI : [10.1038/s41416-019-0667-3](https://doi.org/10.1038/s41416-019-0667-3) (cité page 16).
- [56] Sheng Tao ZHOU, Can Hua HUANG et Yu Quan WEI. « The metabolic switch and its regulation in cancer cells ». In : *Science China Life Sciences* 53.8 (août 2010), p. 942-958. DOI : [10.1007/s11427-010-4041-1](https://doi.org/10.1007/s11427-010-4041-1) (cité page 16).
- [57] Li YU et al. « The Glycolytic Switch in Tumors : How Many Players Are Involved? » In : *Journal of Cancer* 8.17 (2017), p. 3430-3440. DOI : [10.7150/jca.21125](https://doi.org/10.7150/jca.21125) (cité page 17).
- [58] Ralph J. DEBERARDINIS et Navdeep S. CHANDEL. « We need to talk about the Warburg effect ». In : *Nature Metabolism* 2.2 (fév. 2020), p. 127-129. DOI : [10.1038/s42255-020-0172-2](https://doi.org/10.1038/s42255-020-0172-2) (cité aux pages 17, 18).

- [59] Michael P. MURPHY et Luke A. J. O'NEILL. « How should we talk about metabolism? » In : *Nature Immunology* 21.7 (juill. 2020), p. 713-715. DOI : [10.1038/s41590-020-0691-8](https://doi.org/10.1038/s41590-020-0691-8) (cité page 17).
- [60] Zhengtao XIAO, Ziwei DAI et Jason W. LOCASALE. « Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution ». In : *Nature Communications* 10.1 (déc. 2019), p. 3763. DOI : [10.1038/s41467-019-11738-0](https://doi.org/10.1038/s41467-019-11738-0) (cité aux pages 17-19, 37, 38, 40).
- [61] Ahmad ALMUHAIDEB, Nikolaos PAPATHANASIOU et Jamshed BOMANJI. « F-FDG PET/CT Imaging In Oncology ». In : *Annals of Saudi Medicine* 31.1 (2011), p. 3-13. DOI : [10.4103/0256-4947.75771](https://doi.org/10.4103/0256-4947.75771) (cité page 18).
- [62] Brandon FAUBERT, Ashley SOLMONSON et Ralph J. DEBERARDINIS. « Metabolic reprogramming and cancer progression ». In : *Science* 368.6487 (avr. 2020), eaaw5473. DOI : [10.1126/science.aaw5473](https://doi.org/10.1126/science.aaw5473) (cité page 18).
- [63] Go J. YOSHIDA. « Metabolic reprogramming : the emerging concept and associated therapeutic strategies ». In : *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 34.1 (déc. 2015), p. 111. DOI : [10.1186/s13046-015-0221-y](https://doi.org/10.1186/s13046-015-0221-y) (cité aux pages 18, 36).
- [64] Gerald A. DIENEL et Nancy F. CRUZ. « Aerobic glycolysis during brain activation : adrenergic regulation and influence of norepinephrine on astrocytic metabolism ». In : *Journal of Neurochemistry* 138.1 (juill. 2016), p. 14-52. DOI : [10.1111/jnc.13630](https://doi.org/10.1111/jnc.13630) (cité page 18).
- [65] William JONES et Katiuscia BIANCHI. « Aerobic glycolysis : Beyond proliferation ». In : *Frontiers in Immunology* 6.MAY (mai 2015). DOI : [10.3389/fimmu.2015.00227](https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00227) (cité page 18).
- [66] Maria Pires PACHECO et al. « Identifying and targeting cancer-specific metabolism with network-based drug target prediction ». In : *EBioMedicine* 43 (mai 2019), p. 98-106. DOI : [10.1016/j.ebiom.2019.04.046](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.046) (cité page 18).
- [67] Erez PERSI et al. « Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy ». In : *Nature Communications* 9.1 (2018). DOI : [10.1038/s41467-018-05261-x](https://doi.org/10.1038/s41467-018-05261-x) (cité page 18).
- [68] Mehdi DAMAGHI, Jonathan W. WOJTKOWIAK et Robert J. GILLIES. « pH sensing and regulation in cancer ». In : *Frontiers in Physiology* 4 DEC (2013). DOI : [10.3389/fphys.2013.00370](https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00370) (cité page 18).
- [69] Katharine A. WHITE, Bree K. GRILLO-HILL et Diane L. BARBER. « Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance ». In : *Journal of Cell Science* 130.4 (fév. 2017), p. 663-669. DOI : [10.1242/jcs.195297](https://doi.org/10.1242/jcs.195297) (cité page 18).
- [70] Xiao LUO et al. « Highly Sensitive Hill-Type Small-Molecule pH Probe That Recognizes the Reversed pH Gradient of Cancer Cells ». In : *Analytical Chemistry* 90.9 (mai 2018), p. 5803-5809. DOI : [10.1021/acs.analchem.8b00218](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00218) (cité page 18).
- [71] Ming Zhu JIN et Wei Lin JIN. « The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing ». In : *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5.1 (déc. 2020), p. 166. DOI : [10.1038/s41392-020-00280-x](https://doi.org/10.1038/s41392-020-00280-x) (cité page 18).
- [72] A. STRICKAERT et al. « Cancer heterogeneity is not compatible with one unique cancer cell metabolic map ». In : *Oncogene* 36.19 (mai 2017), p. 2637-2642. DOI : [10.1038/onc.2016.411](https://doi.org/10.1038/onc.2016.411) (cité aux pages 19, 119).
- [73] Chiara DAMIANI et al. « Integration of single-cell RNA-seq data into population models to characterize cancer metabolism ». In : *PLoS Computational Biology* 15.2 (fév. 2019). Sous la dir. de Christoph KALETA, e1006733. DOI : [10.1371/journal.pcbi.1006733](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006733) (cité aux pages 19, 129).

- [74] Pierre SONVEAUX et al. « Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice ». In : *Journal of Clinical Investigation* 118.12 (déc. 2008), p. 3930-3942. DOI : [10.1172/JCI36843](https://doi.org/10.1172/JCI36843) (cité page 19).
- [75] Mark W. DEWHIRST, Yiting CAO et Benjamin MOELLER. « Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response ». In : *Nature Reviews Cancer* 8.6 (juin 2008), p. 425-437. DOI : [10.1038/nrc2397](https://doi.org/10.1038/nrc2397) (cité page 19).
- [76] Mark W. DEWHIRST. « Relationships between Cycling Hypoxia, HIF-1, Angiogenesis and Oxidative Stress ». In : *Radiation Research* 172.6 (déc. 2009), p. 653-665. DOI : [10.1667/RR1926.1](https://doi.org/10.1667/RR1926.1) (cité aux pages 19, 95).
- [77] Joe WOLFE. *Cellular Thermodynamics : The Molecular and Macroscopic Views*. 2015. DOI : [10.1002/9780470015902.a0001363.pub2](https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001363.pub2) (cité page 20).
- [78] J. J. CASCIARI, S. V. SOTIRCHOS et R. M. SUTHERLAND. « Mathematical modelling of microenvironment and growth in EMT6/Ro multicellular tumour spheroids ». In : *Cell Proliferation* 25.1 (1992), p. 1-22. DOI : <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1992.tb01433.x> (cité aux pages 22, 56).
- [79] Christopher DuBois et al. « A multiple time-scale computational model of a tumor and its micro environment ». In : *Mathematical Biosciences and Engineering* 10.1 (2012), p. 121-150. DOI : [10.3934/mbe.2013.10.121](https://doi.org/10.3934/mbe.2013.10.121) (cité page 22).
- [80] Colin PHIPPS, Hamid MOLAVIAN et Mohammad KOHANDEL. « A microscale mathematical model for metabolic symbiosis : Investigating the effects of metabolic inhibition on ATP turnover in tumors ». In : *Journal of Theoretical Biology* 366 (2015), p. 103-114. DOI : [10.1016/j.jtbi.2014.11.016](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.11.016) (cité page 22).
- [81] Nick JAGIELLA et al. « Inferring Growth Control Mechanisms in Growing Multi-cellular Spheroids of NSCLC Cells from Spatial-Temporal Image Data ». In : *PLOS Computational Biology* 12.2 (fév. 2016). Sous la dir. d'Helen BYRNE, e1004412. DOI : [10.1371/journal.pcbi.1004412](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004412) (cité page 22).
- [82] Milad SHAMSI et al. « Mathematical Modeling of the Function of Warburg Effect in Tumor Microenvironment ». In : *Scientific Reports* 8.1 (2018), p. 1-13. DOI : [10.1038/s41598-018-27303-6](https://doi.org/10.1038/s41598-018-27303-6) (cité page 22).
- [83] F. POURHASANZADE et S. H. SABZPOUSHAN. « A New Mathematical Model for Controlling Tumor Growth Based on Microenvironment Acidity and Oxygen Concentration ». In : *BioMed Research International* 2021 (2021). Sous la dir. de Luis LOURA, p. 1-18. DOI : [10.1155/2021/8886050](https://doi.org/10.1155/2021/8886050) (cité page 22).
- [84] Wenbo LI et Jin WANG. « Uncovering the Underlying Mechanisms of Cancer Metabolism through the Landscapes and Probability Flux Quantifications ». In : *iScience* 23.4 (avr. 2020), p. 101002. DOI : [10.1016/j.isci.2020.101002](https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101002) (cité aux pages 22, 40, 55, 58, 59, 66, 69, 75, 93, 125, 130).
- [85] George E. BILLMAN. « Homeostasis : The Underappreciated and Far Too Often Ignored Central Organizing Principle of Physiology ». In : *Frontiers in Physiology* 11 (2020). DOI : [10.3389/fphys.2020.00200](https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00200) (cité page 23).
- [86] Nicolas GLADE. « Le Vivant Rare, Faible et Amorphe. Evolution depuis les Origines jusqu'à la Vie telle qu'elle nous Apparaît. » Thèse de doct. 2022 (cité page 24).

- [87] Netanya Y. SPENCER et Robert C. STANTON. « The Warburg Effect, Lactate, and Nearly a Century of Trying to Cure Cancer ». In : *Seminars in Nephrology* 39.4 (2019), p. 380-393. DOI : [10.1016/j.semnephrol.2019.04.007](https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2019.04.007) (cité page 26).
- [88] Helmut SIES. *Oxidative Stress Eustress and Distress. Eustress and Distress*. Elsevier Science et Technology, 2019 (cité page 26).
- [89] Massimiliano CAZZANIGA et Bernardo BONANNI. « Relationship between metabolic reprogramming and mitochondrial activity in cancer cells. Understanding the anticancer effect of metformin and its clinical implications ». In : *Anticancer Research* 35.11 (2015), p. 5789-5796 (cité aux pages 26, 36).
- [90] Anna KUBICKA, Karolina MATCZAK et Magdalena ŁABIENIEC-WATAŁA. « More Than Meets the Eye Regarding Cancer Metabolism ». In : *International Journal of Molecular Sciences* 22.17 (2021), p. 9507. DOI : [10.3390/ijms22179507](https://doi.org/10.3390/ijms22179507) (cité page 26).
- [91] R.Brooks ROBNEY et al. « Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism : cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? » In : *Carcinogenesis* 36.Suppl 1 (2015), S203-S231. DOI : [10.1093/carcin/bgv037](https://doi.org/10.1093/carcin/bgv037) (cité page 26).
- [92] Julie RAZUNGLES et al. « L'effet Warburg ». In : *médecine/sciences* 29.11 (2013), p. 1026-1033. DOI : [10.1051/medsci/20132911020](https://doi.org/10.1051/medsci/20132911020) (cité page 28).
- [93] Peter VAUPEL et Gabriele MULTHOFF. « Revisiting the Warburg effect : historical dogma versus current understanding ». In : *The Journal of Physiology* 599.6 (2021), p. 1745-1757. DOI : [10.1113/jp278810](https://doi.org/10.1113/jp278810) (cité page 29).
- [94] Dongya JIA et al. « Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.9 (2019), p. 3909-3918. DOI : [10.1073/pnas.1816391116](https://doi.org/10.1073/pnas.1816391116) (cité page 30).
- [95] Dongning WANG et al. « Oxygen Flux Analysis to Understand the Biological Function of Sirtuins ». In : *Sirtuins*. Humana Press, 2013, p. 241-258. DOI : [10.1007/978-1-62703-637-5_16](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-637-5_16) (cité page 30).
- [96] Barbara MUZ et al. « The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy ». In : *Hypoxia* (2015), p. 83. DOI : [10.2147/hp.s93413](https://doi.org/10.2147/hp.s93413) (cité page 31).
- [97] Asieh Emami NEJAD et al. « The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell : a novel approach to developing treatment ». In : *Cancer Cell International* 21.1 (2021). DOI : [10.1186/s12935-020-01719-5](https://doi.org/10.1186/s12935-020-01719-5) (cité page 31).
- [98] Shamir CASSIM et al. « Warburg and Beyond : The Power of Mitochondrial Metabolism to Collaborate or Replace Fermentative Glycolysis in Cancer ». In : *Cancers* 12.5 (2020), p. 1119. DOI : [10.3390/cancers12051119](https://doi.org/10.3390/cancers12051119) (cité page 31).
- [99] Stephanos PAVLIDES et al. « The reverse Warburg effect : Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma ». In : *Cell Cycle* 8.23 (2009), p. 3984-4001. DOI : [10.4161/cc.8.23.10238](https://doi.org/10.4161/cc.8.23.10238) (cité page 32).
- [100] L. Bruce GLADDEN et al. « Fuel for cancer cells? » In : *Cell Cycle* 10.15 (2011), p. 2422-2422. DOI : [10.4161/cc.10.15.16387](https://doi.org/10.4161/cc.10.15.16387) (cité page 32).
- [101] Chelsea SCHILIRO et Bonnie L. FIRESTEIN. « Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation ». In : *Cells* 10.5 (2021), p. 1056. DOI : [10.3390/cells10051056](https://doi.org/10.3390/cells10051056) (cité page 32).

- [102] Laura H. GOETZ et Nicholas J. SCHORK. « Personalized medicine : motivation, challenges, and progress ». In : *Fertility and Sterility* 109.6 (2018), p. 952-963. DOI : [10.1016/j.fertnstert.2018.05.006](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.05.006) (cité page 34).
- [103] Atsushi NIIDA et al. « A unified simulation model for understanding the diversity of cancer evolution ». In : *PeerJ* 8 (2020), e8842. DOI : [10.7717/peerj.8842](https://doi.org/10.7717/peerj.8842) (cité page 34).
- [104] Jean HAUSSEER et al. « Tumor diversity and the trade-off between universal cancer tasks ». In : *Nature Communications* 10.1 (2019). DOI : [10.1038/s41467-019-13195-1](https://doi.org/10.1038/s41467-019-13195-1) (cité page 34).
- [105] Itai YANAI et Martin LERCHER. « The two languages of science ». In : *Genome Biology* 21.1 (2020). DOI : [10.1186/s13059-020-02057-5](https://doi.org/10.1186/s13059-020-02057-5) (cité page 35).
- [106] J. FOUCAUD et al. « Baromètrecancer 2015. Cancer et facteurs de risque. Opinions et perceptions de la population française. » In : *Institut national du cancer. Santé publique France. Ed. Saint-Maurice* (2018) (cité page 35).
- [107] Michel REICH. « Cancer et image du corps : identité, représentation et symbolique ». In : *L'information psychiatrique* 85.3 (2009), p. 247. DOI : [10.3917/inpsy.8503.0247](https://doi.org/10.3917/inpsy.8503.0247) (cité page 35).
- [108] Thomas HEAMS. « An endodarwinian approach of intercellular variability of gene expression ». Theses. INAPG (AgroParisTech), mai 2004 (cité page 35).
- [109] Haoyang LI et al. « CaMeRe : A Novel Tool for Inference of Cancer Metabolic Reprogramming ». In : *Frontiers in Oncology* 10 (fév. 2020). DOI : [10.3389/fonc.2020.00207](https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00207) (cité page 36).
- [110] Zita CARVALHO-SANTOS et al. « Cellular metabolic reprogramming controls sugar appetite in *Drosophila* ». In : *Nature Metabolism* 2.9 (sept. 2020), p. 958-973. DOI : [10.1038/s42255-020-0266-x](https://doi.org/10.1038/s42255-020-0266-x) (cité page 36).
- [111] Andrzej K. KONOPKA. « Grand metaphors of biology in the genome era ». In : *Computers and Chemistry* 26.5 (juill. 2002), p. 397-401. DOI : [10.1016/S0097-8485\(02\)00024-4](https://doi.org/10.1016/S0097-8485(02)00024-4) (cité page 36).
- [112] Carmen McLEOD et Brigitte NERLICH. « Synthetic biology, metaphors and responsibility ». In : *Life Sciences, Society and Policy* 13.1 (déc. 2017), p. 13. DOI : [10.1186/s40504-017-0061-y](https://doi.org/10.1186/s40504-017-0061-y) (cité page 36).
- [113] Maarten BOUDRY et Massimo PIGLIUCCI. « The mismeasure of machine : Synthetic biology and the trouble with engineering metaphors ». In : *Studies in History and Philosophy of Science Part C : Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* 44.4 (déc. 2013), p. 660-668. DOI : [10.1016/j.shpsc.2013.05.013](https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2013.05.013) (cité page 36).
- [114] Olaf WOLKENHAUER et al. « The dynamic systems approach to control and regulation of intracellular networks ». In : *FEBS Letters* 579.8 (2005), p. 1846-1853. DOI : [10.1016/j.febslet.2005.02.008](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.008) (cité page 37).
- [115] SCARDOVI ITALO. « Rereading Darwin. Notes for a critical history of indeterminism ». In : *Statistica ; Vol 69* (2013), No 2/3 (2009), 117-127. DOI : [10.6092/ISSN.1973-2201/3551](https://doi.org/10.6092/ISSN.1973-2201/3551) (cité page 37).
- [116] Liem Minh PHAN, Sai Ching Jim YEUNG et Mong Hong LEE. « Cancer metabolic reprogramming : importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies ». In : *Cancer Biology and Medicine* 11.1 (mars 2014), p. 1-19. DOI : [10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001](https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001) (cité page 38).

- [117] Ayla V. ORANG et al. « Micromanaging aerobic respiration and glycolysis in cancer cells ». In : *Molecular Metabolism* 23 (mai 2019), p. 98-126. DOI : [10.1016/j.molmet.2019.01.014](https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.01.014) (cité page 38).
- [118] Fionnuala MORRISH et al. « The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry ». In : *Cell Cycle* 7.8 (avr. 2008), p. 1054-1066. DOI : [10.4161/cc.7.8.5739](https://doi.org/10.4161/cc.7.8.5739) (cité page 38).
- [119] Andrew M. INTLEKOFER et Lydia W. S. FINLEY. « Metabolic signatures of cancer cells and stem cells ». In : *Nature Metabolism* 1.2 (fév. 2019), p. 177-188. DOI : [10.1038/s42255-019-0032-0](https://doi.org/10.1038/s42255-019-0032-0) (cité page 38).
- [120] Di ZHANG et al. « Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation ». In : *Nature* 574.7779 (oct. 2019), p. 575-580. DOI : [10.1038/s41586-019-1678-1](https://doi.org/10.1038/s41586-019-1678-1) (cité page 38).
- [121] Ramya KUMARESWARAN et al. « Chronic hypoxia compromises repair of DNA double-strand breaks to drive genetic instability ». In : *Journal of Cell Science* 125.1 (jan. 2012), p. 189-199. DOI : [10.1242/jcs.092262](https://doi.org/10.1242/jcs.092262) (cité page 38).
- [122] Fran BALKWILL et Alberto MANTOVANI. « Inflammation and cancer : Back to Virchow ? » In : *Lancet* 357.9255 (fév. 2001), p. 539-545. DOI : [10.1016/S0140-6736\(00\)04046-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04046-0) (cité page 38).
- [123] Jean Christophe MARINE, Sarah Jane DAWSON et Mark A. DAWSON. « Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer ». In : *Nature Reviews Cancer* 20.12 (déc. 2020), p. 743-756. DOI : [10.1038/s41568-020-00302-4](https://doi.org/10.1038/s41568-020-00302-4) (cité page 38).
- [124] Elena LASTRAIOLI, Jessica IORIO et Annarosa ARCANGELI. « Ion channel expression as promising cancer biomarker ». In : *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1848.10 (oct. 2015), p. 2685-2702. DOI : [10.1016/j.bbamem.2014.12.016](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.12.016) (cité page 39).
- [125] Aaron N. BROOKS et al. « Adaptation of cells to new environments ». In : *WIREs Systems Biology and Medicine* 3.5 (2010), p. 544-561. DOI : [10.1002/wsbm.136](https://doi.org/10.1002/wsbm.136) (cité page 39).
- [126] Katsuyuki YUGI et Shinya KURODA. « Metabolism-Centric Trans-Omics ». In : *Cell Systems* 4.1 (jan. 2017), p. 19-20. DOI : [10.1016/j.cels.2017.01.007](https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.01.007) (cité page 40).
- [127] John M. SAUL et Laurent SCHWARTZ. « Cancer as a consequence of the rising level of oxygen in the Late Precambrian ». In : *Lethaia* 40.3 (2007), p. 211-220. DOI : [10.1111/j.1502-3931.2007.00014.x](https://doi.org/10.1111/j.1502-3931.2007.00014.x) (cité page 40).
- [128] Ruth J. PYE et al. « A second transmissible cancer in Tasmanian devils ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.2 (2015), p. 374-379. DOI : [10.1073/pnas.1519691113](https://doi.org/10.1073/pnas.1519691113) (cité page 40).
- [129] Frédéric THOMAS et al. *L'abominable secret du cancer*. HUMENSCIENCES, 2022 (cité aux pages 40, 41).
- [130] Kimberline R YANG et al. « Niche Inheritance : A Cooperative Pathway to Enhance Cancer Cell Fitness Through Ecosystem Engineering ». In : *Journal of Cellular Biochemistry* 115.9 (2014), p. 1478-1485. DOI : [10.1002/jcb.24813](https://doi.org/10.1002/jcb.24813) (cité page 41).
- [131] Jingsong ZHANG et al. « Integrating evolutionary dynamics into treatment of metastatic castrate-resistant prostate cancer ». In : *Nature Communications* 8.1 (2017). DOI : [10.1038/s41467-017-01968-5](https://doi.org/10.1038/s41467-017-01968-5) (cité page 41).

- [132] Frédéric THOMAS et al. « Cancer adaptations : Atavism, de novo selection, or something in between? » In : *BioEssays* 39.8 (2017), p. 1700039. DOI : [10.1002/bies.201700039](https://doi.org/10.1002/bies.201700039) (cité page 42).
- [133] Mark C. LLOYD et al. « Darwinian Dynamics of Intratumoral Heterogeneity : Not Solely Random Mutations but Also Variable Environmental Selection Forces ». In : *Cancer Research* 76.11 (2016), p. 3136-3144. DOI : [10.1158/0008-5472.can-15-2962](https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-15-2962) (cité page 42).
- [134] Mark VINCENT. « Cancer : A de-repression of a default survival program common to all cells? » In : *BioEssays* 34.1 (2011), p. 72-82. DOI : [10.1002/bies.201100049](https://doi.org/10.1002/bies.201100049) (cité page 42).
- [135] Anna S TRIGOS et al. « How the evolution of multicellularity set the stage for cancer ». In : *British Journal of Cancer* 118.2 (2018), p. 145-152. DOI : [10.1038/bjc.2017.398](https://doi.org/10.1038/bjc.2017.398) (cité page 42).
- [136] Remi SEGRETAIN et al. « Who Plays Complex Music? On the Correlations Between Structural and Behavioral Complexity Measures in Sign Boolean Networks ». In : *2021 IEEE 21st International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE)*. IEEE, 2021. DOI : [10.1109/bibe52308.2021.9635403](https://doi.org/10.1109/bibe52308.2021.9635403) (cité page 42).
- [137] Xiao-Ming LIU et al. « A persistently low level of atmospheric oxygen in Earth's middle age ». In : *Nature Communications* 12.1 (2021). DOI : [10.1038/s41467-020-20484-7](https://doi.org/10.1038/s41467-020-20484-7) (cité page 42).
- [138] P C W DAVIES et C H LINEWEAVER. « Cancer tumors as Metazoa 1.0 : tapping genes of ancient ancestors ». In : *Physical Biology* 8.1 (2011), p. 015001. DOI : [10.1088/1478-3975/8/1/015001](https://doi.org/10.1088/1478-3975/8/1/015001) (cité page 42).
- [139] Michele ZANONI et al. « 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening : a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained ». In : *Scientific Reports* 6.1 (2016). DOI : [10.1038/srep19103](https://doi.org/10.1038/srep19103) (cité page 45).
- [140] Marie BEURTON-AIMAR, Tung Vu-Ngoc NGUYEN et Sophie COLOMBIÉ. « Metabolic Network Reconstruction and Their Topological Analysis ». In : *Plant Metabolic Flux Analysis*. Humana Press, 2013, p. 19-38. DOI : [10.1007/978-1-62703-688-7_2](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-688-7_2) (cité page 46).
- [141] Kamil KĘDZIA et al. « Simulation of multicellular populations with Petri nets and genome scale intracellular networks ». In : *Science of Computer Programming* 157 (2018), p. 3-16. DOI : [10.1016/j.scico.2017.10.002](https://doi.org/10.1016/j.scico.2017.10.002) (cité page 46).
- [142] Jeffrey D ORTH, Ines THIELE et Bernhard Ø PALSSON. « What is flux balance analysis? » In : *Nature Biotechnology* 28.3 (2010), p. 245-248. DOI : [10.1038/nbt.1614](https://doi.org/10.1038/nbt.1614) (cité page 46).
- [143] William R. HARCUMBE et al. « The Ability of Flux Balance Analysis to Predict Evolution of Central Metabolism Scales with the Initial Distance to the Optimum ». In : *PLoS Computational Biology* 9.6 (2013). Sous la dir. de Jorg STELLING, e1003091. DOI : [10.1371/journal.pcbi.1003091](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003091) (cité page 47).
- [144] Claudio ANGIONE. « Human Systems Biology and Metabolic Modelling : A Review—From Disease Metabolism to Precision Medicine ». In : *BioMed Research International* 2019 (2019), p. 1-16. DOI : [10.1155/2019/8304260](https://doi.org/10.1155/2019/8304260) (cité page 47).
- [145] Radhakrishnan MAHADEVAN, Jeremy S. EDWARDS et Francis J. DOYLE. « Dynamic Flux Balance Analysis of Diauxic Growth in Escherichia coli ». In : *Biophysical Journal* 83.3 (2002), p. 1331-1340. DOI : [10.1016/s0006-3495\(02\)73903-9](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(02)73903-9) (cité page 47).
- [146] Steinn GUDMUNDSSON et Ines THIELE. « Computationally efficient flux variability analysis ». In : *BMC Bioinformatics* 11.1 (2010). DOI : [10.1186/1471-2105-11-489](https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-489) (cité page 48).

- [147] Michael A. SAVAGEAU, Eberhard O. VOIT et Douglas H. IRVINE. « Biochemical systems theory and metabolic control theory : 1. fundamental similarities and differences ». In : *Mathematical Biosciences* 86.2 (1987), p. 127-145. DOI : [10.1016/0025-5564\(87\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0025-5564(87)90007-1) (cité page 50).
- [148] Santiago SCHNELL. « Validity of the Michaelis-Menten equation - steady-state or reactant stationary assumption : that is the question ». In : *FEBS Journal* 281.2 (2013), p. 464-472. DOI : [10.1111/febs.12564](https://doi.org/10.1111/febs.12564) (cité page 50).
- [149] Sumit Kumar JHA et Christopher James LANGMEAD. « Exploring behaviors of stochastic differential equation models of biological systems using change of measures ». In : *BMC Bioinformatics* 13.S5 (2012). DOI : [10.1186/1471-2105-13-s5-s8](https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-s5-s8) (cité page 51).
- [150] R. BARDINI et al. « Multi-level and hybrid modelling approaches for systems biology ». In : *Computational and Structural Biotechnology Journal* 15 (2017), p. 396-402. DOI : [10.1016/j.csbj.2017.07.005](https://doi.org/10.1016/j.csbj.2017.07.005) (cité page 52).
- [151] Ahmadreza GHAFARIZADEH et al. « PhysiCell : An open source physics-based cell simulator for 3-D multicellular systems ». In : *PLOS Computational Biology* 14.2 (fév. 2018). Sous la dir. de Timothée POISOT, e1005991. DOI : [10.1371/journal.pcbi.1005991](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005991) (cité aux pages 53, 60, 65, 77).
- [152] Arnau MONTAGUD, Miguel Ponce DE-LEON et Alfonso VALENCIA. « Systems biology at the giga-scale : Large multiscale models of complex, heterogeneous multicellular systems ». In : *Current Opinion in Systems Biology* 28 (2021), p. 100385. DOI : [10.1016/j.coisb.2021.100385](https://doi.org/10.1016/j.coisb.2021.100385) (cité aux pages 52, 53).
- [153] Angélique STÉPHANOU. « Une Approche Computationnelle pour l'Étude de Processus Morphogénétiques - de la motilité des cellules à la croissance des vaisseaux ». Habilitation à diriger des recherches. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, déc. 2011 (cité page 52).
- [154] Mathematical GAMES. « The fantastic combinations of John Conway's new solitaire game "life" by Martin Gardner ». In : *Scientific American* 223 (1970), p. 120-123 (cité page 52).
- [155] François GRANER et James A. GLAZIER. « Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended Potts model ». In : *Phys. Rev. Lett.* 69 (13 sept. 1992), p. 2013-2016. DOI : [10.1103/PhysRevLett.69.2013](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.69.2013) (cité page 53).
- [156] Ariel BALTER et al. « The Glazier-Graner-Hogeweg Model : Extensions, Future Directions, and Opportunities for Further Study ». In : *Single-Cell-Based Models in Biology and Medicine*. Birkhäuser Basel, 2007, p. 151-167. DOI : [10.1007/978-3-7643-8123-3_7](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8123-3_7) (cité page 53).
- [157] Nicholas J. SAVILL et Paulien HOGEWEG. « Modelling Morphogenesis : From Single Cells to Crawling Slugs ». In : *Journal of Theoretical Biology* 184.3 (1997), p. 229-235. DOI : [10.1006/jtbi.1996.0237](https://doi.org/10.1006/jtbi.1996.0237) (cité page 53).
- [158] Maciej H. SWAT et al. « Multi-Scale Modeling of Tissues Using CompuCell3D ». In : *Methods in Cell Biology*. Elsevier, 2012, p. 325-366. DOI : [10.1016/b978-0-12-388403-9.00013-8](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-388403-9.00013-8) (cité aux pages 53, 60).
- [159] Fergus COOPER et al. « Chaste : Cancer, Heart and Soft Tissue Environment ». In : *Journal of Open Source Software* 5.47 (2020), p. 1848. DOI : [10.21105/joss.01848](https://doi.org/10.21105/joss.01848) (cité page 53).
- [160] Stefan HOEHME et Dirk DRASDO. « A cell-based simulation software for multi-cellular systems ». In : *Bioinformatics* 26.20 (2010), p. 2641-2642. DOI : [10.1093/bioinformatics/btq437](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq437) (cité page 53).

- [161] S. KANG et al. « Biocellion : accelerating computer simulation of multicellular biological system models ». In : *Bioinformatics* 30.21 (2014), p. 3101-3108. DOI : [10.1093/bioinformatics/btu498](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu498) (cité aux pages 53, 60).
- [162] Christian-Jacques LARSEN. « Sphéroïdes : le modèle de référence pour la culture in vitro des tumeurs solides ? ». In : *Bulletin du Cancer* 105.1 (2018), p. 25-34. DOI : [10.1016/j.bulcan.2017.09.008](https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2017.09.008) (cité page 54).
- [163] Joseph J. CASCIARI, Stratis V. SOTIRCHOS et Robert M. SUTHERLAND. « Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH ». In : *Journal of Cellular Physiology* 151.2 (1992), p. 386-394. DOI : [10.1002/jcp.1041510220](https://doi.org/10.1002/jcp.1041510220) (cité page 55).
- [164] W. MUELLER-KLIESER, J. P. FREYER et R. M. SUTHERLAND. « Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids ». In : *British Journal of Cancer* 53.3 (1986), p. 345-353. DOI : [10.1038/bjc.1986.58](https://doi.org/10.1038/bjc.1986.58) (cité page 55).
- [165] Hao WU, Minfeng YING et Xun HU. « Lactic acidosis switches cancer cells from aerobic glycolysis back to dominant oxidative phosphorylation ». In : *Oncotarget* 7.26 (2016), p. 36-38. DOI : [10.18632/oncotarget.9746](https://doi.org/10.18632/oncotarget.9746) (cité aux pages 55, 57, 130).
- [166] Simone FULDA et Klaus-Michael Michael DEBATIN. « HIF-1-regulated glucose metabolism : A key to apoptosis resistance ? ». In : *Cell Cycle* 6.7 (avr. 2007), p. 790-792. DOI : [10.4161/cc.6.7.4084](https://doi.org/10.4161/cc.6.7.4084) (cité page 55).
- [167] Katrin DIETL et al. « Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes ». In : *The Journal of Immunology* 184.3 (fév. 2010), p. 1200-1209. DOI : [10.4049/jimmunol.0902584](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902584) (cité page 55).
- [168] Mary Pat FELLEENZ et Leo E. GERWECK. « Influence of Extracellular pH on Intracellular pH and Cell Energy Status : Relationship to Hyperthermic Sensitivity ». In : *Radiation Research* 116.2 (nov. 1988), p. 305. DOI : [10.2307/3577466](https://doi.org/10.2307/3577466) (cité page 55).
- [169] Pierre JACQUET et Angélique STÉPHANOU. « A simplified model of cell metabolism to revisit the glycolysis-OXPHOS relationship in the deregulated tumor microenvironment ». In : (2019) (cité page 56).
- [170] Oleg SHVALOV et al. « Linking Metabolic Reprogramming, Plasticity and Tumor Progression ». In : *Cancers* 13.4 (2021), p. 762. DOI : [10.3390/cancers13040762](https://doi.org/10.3390/cancers13040762) (cité page 57).
- [171] Heriberto PRADO-GARCIA, Andrea CAMPA-HIGAREDA et Susana ROMERO-GARCIA. « Lactic Acidosis in the Presence of Glucose Diminishes Warburg Effect in Lung Adenocarcinoma Cells ». In : *Frontiers in Oncology* 10 (2020). DOI : [10.3389/fonc.2020.00807](https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00807) (cité page 57).
- [172] Sandesh Athni HIREMATH et al. « Modeling of pH regulation in tumor cells : Direct interaction between proton-coupled lactate transporters and cancer-associated carbonicanhydrase ». In : *Mathematical Biosciences and Engineering* 16.1 (2019), p. 320-337. DOI : [10.3934/mbe.2019016](https://doi.org/10.3934/mbe.2019016) (cité page 57).
- [173] Nicola PIASENTIN, Edoardo MILOTTI et Roberto CHIGNOLA. « The control of acidity in tumor cells : a biophysical model ». In : *Scientific Reports* 10.1 (2020). DOI : [10.1038/s41598-020-70396-1](https://doi.org/10.1038/s41598-020-70396-1) (cité page 57).
- [174] Alvaro MARÍN-HERNÁNDEZ et al. « Modeling cancer glycolysis ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807.6 (2011), p. 755-767. DOI : [10.1016/j.bbabbio.2010.11.006](https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.11.006) (cité page 58).

- [175] Gary R. MIRAMS et al. « Chaste : An Open Source C++ Library for Computational Physiology and Biology ». In : *PLoS Computational Biology* 9.3 (2013). DOI : [10.1371/journal.pcbi.1002970](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002970) (cité page 60).
- [176] Angélique STÉPHANOU, Pascal BALLETT et Gibin POWATHIL. « Hybrid Modelling in Oncology : Successes, Challenges and Hopes ». In : (jan. 2019), p. 1-12. DOI : [10.1051/mmnp/2019026](https://doi.org/10.1051/mmnp/2019026) (cité page 61).
- [177] S R McKEOWN. « Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response ». In : *The British Journal of Radiology* 87.1035 (2014), p. 20130676. DOI : [10.1259/bjr.20130676](https://doi.org/10.1259/bjr.20130676) (cité aux pages 64, 69).
- [178] Romain VALABRÈGUE et al. « Relation between Cerebral Blood Flow and Metabolism Explained by a Model of Oxygen Exchange ». In : *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23.5 (2003), p. 536-545. DOI : [10.1097/01.wcb.0000055178.31872.38](https://doi.org/10.1097/01.wcb.0000055178.31872.38) (cité page 64).
- [179] Jorge OTERO et al. « Oxygen Biosensors and Control in 3D Physiomimetic Experimental Models ». In : *Antioxidants* 10.8 (2021), p. 1165. DOI : [10.3390/antiox10081165](https://doi.org/10.3390/antiox10081165) (cité page 64).
- [180] Thomas Litman WILFRED D. STEIN. « Channels, Carriers, and Pumps : An Introduction to Membrane Transport ». In : ACADEMIC PR INC, déc. 2014, p. 32 (cité page 64).
- [181] Ana I. GARCIA-PÉREZ et al. « Molecular Crowding and Viscosity as Determinants of Translational Diffusion of Metabolites in Subcellular Organelles ». In : *Archives of Biochemistry and Biophysics* 362.2 (1999), p. 329-338. DOI : [10.1006/abbi.1998.1051](https://doi.org/10.1006/abbi.1998.1051) (cité page 64).
- [182] E. L. CUSSLER. *Diffusion : Mass Transfer in Fluid Systems*. CAMBRIDGE, jan. 2009. 631 p. (cité page 64).
- [183] Irwin H. SEGEL. *Enzyme kinetics : behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems / Irwin H. Segel*. eng. New York : Wiley, 1975 (cité page 66).
- [184] Karsten AHNERT et al. « Odeint - Solving Ordinary Differential Equations in C++ ». In : *AIP Conference Proceedings*. AIP, 2011. DOI : [10.1063/1.3637934](https://doi.org/10.1063/1.3637934) (cité page 67).
- [185] Marilyn E. MORRIS et Melanie A. FELMLEE. « Overview of the Proton-coupled MCT (SLC16A) Family of Transporters : Characterization, Function and Role in the Transport of the Drug of Abuse γ -Hydroxybutyric Acid ». In : *The AAPS Journal* 10.2 (2008). DOI : [10.1208/s12248-008-9035-6](https://doi.org/10.1208/s12248-008-9035-6) (cité page 70).
- [186] Aaron MEURER et al. « SymPy : symbolic computing in Python ». In : *PeerJ Computer Science* 3 (jan. 2017), e103. DOI : [10.7717/peerj-cs.103](https://doi.org/10.7717/peerj-cs.103) (cité page 72).
- [187] Edward T. URBANSKY et Michael R. SCHOCK. « Understanding, Deriving, and Computing Buffer Capacity ». In : *Journal of Chemical Education* 77.12 (2000), p. 1640. DOI : [10.1021/ed077p1640](https://doi.org/10.1021/ed077p1640) (cité page 74).
- [188] Takamitsu A KATO et al. « In vitro characterization of cells derived from chordoma cell line U-CH1 following treatment with X-rays, heavy ions and chemotherapeutic drugs ». In : *Radiation Oncology* 6.1 (2011). DOI : [10.1186/1748-717x-6-116](https://doi.org/10.1186/1748-717x-6-116) (cité page 77).
- [189] Marcel LEIST et al. « Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration : A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis ». In : *Journal of Experimental Medicine* 185.8 (1997), p. 1481-1486. DOI : [10.1084/jem.185.8.1481](https://doi.org/10.1084/jem.185.8.1481) (cité page 78).
- [190] Alexander SCHMITZ et al. « Multiscale image analysis reveals structural heterogeneity of the cell microenvironment in homotypic spheroids ». In : *Scientific Reports* 7.1 (2017). DOI : [10.1038/srep43693](https://doi.org/10.1038/srep43693) (cité aux pages 79, 80).

- [191] RStudio, INC. *Easy web applications in R*. 2013. URL : <http://www.rstudio.com/shiny/> (cité page 83).
- [192] Trenton L. PLACE, Frederick E. DOMANN et Adam J. CASE. « Limitations of oxygen delivery to cells in culture : An underappreciated problem in basic and translational research ». In : *Free Radical Biology and Medicine* 113 (2017), p. 311-322. DOI : [10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.003](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.003) (cité page 86).
- [193] Samuel B. BADER, Mark W. DEWHIRST et Ester M. HAMMOND. « Cyclic Hypoxia : An Update on Its Characteristics, Methods to Measure It and Biological Implications in Cancer ». In : *Cancers* 13.1 (2020), p. 23. DOI : [10.3390/cancers13010023](https://doi.org/10.3390/cancers13010023) (cité page 95).
- [194] Archana M. NAVALE et Archana N. PARANJAPÉ. « Glucose transporters : physiological and pathological roles ». In : *Biophysical Reviews* 8.1 (2016), p. 5-9. DOI : [10.1007/s12551-015-0186-2](https://doi.org/10.1007/s12551-015-0186-2) (cité page 108).
- [195] Suraj Kumar SINGH et al. « Critical role of three-dimensional tumorsphere size on experimental outcome ». In : *BioTechniques* 69.5 (2020), p. 333-338. DOI : [10.2144/btn-2020-0081](https://doi.org/10.2144/btn-2020-0081) (cité page 114).
- [196] Juergen FRIEDRICH et al. « Spheroid-based drug screen : considerations and practical approach ». In : *Nature Protocols* 4.3 (2009), p. 309-324. DOI : [10.1038/nprot.2008.226](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226) (cité page 114).
- [197] Stefan WALENTA et al. « Metabolic Imaging in Multicellular Spheroids of Oncogene-transfected Fibroblasts ». In : *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 48.4 (2000), p. 509-522. DOI : [10.1177/002215540004800409](https://doi.org/10.1177/002215540004800409) (cité page 126).
- [198] Ana S. NUNES et al. « 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs ». In : *Biotechnology and Bioengineering* 116.1 (2018), p. 206-226. DOI : [10.1002/bit.26845](https://doi.org/10.1002/bit.26845) (cité page 126).
- [199] de la CRUZ-LÓPEZ KG et al. « Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches ». In : *Frontiers in Oncology* 9 (nov. 2019). DOI : [10.3389/fonc.2019.01143](https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01143) (cité page 126).
- [200] Patrick S. WARD et Craig B. THOMPSON. « Metabolic Reprogramming : A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate ». In : *Cancer Cell* 21.3 (mars 2012), p. 297-308. DOI : [10.1016/j.ccr.2012.02.014](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.014) (cité page 129).
- [201] Brian ORTMANN, Jimena DRUKER et Sonia ROCHA. « Cell cycle progression in response to oxygen levels ». In : *Cellular and Molecular Life Sciences* 71.18 (2014), p. 3569-3582. DOI : [10.1007/s00018-014-1645-9](https://doi.org/10.1007/s00018-014-1645-9) (cité page 130).
- [202] Minori KOSHIJI et al. « HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc ». In : *The EMBO Journal* 23.9 (2004), p. 1949-1956. DOI : [10.1038/sj.emboj.7600196](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600196) (cité page 130).
- [203] Anne-Cécile LESART et al. « On the importance of the submicrovascular network in a computational model of tumour growth ». In : *Microvascular Research* 84.2 (2012), p. 188-204. DOI : [10.1016/j.mvr.2012.06.001](https://doi.org/10.1016/j.mvr.2012.06.001) (cité page 131).
- [204] Ahmad A. CLUNTUN et al. « Glutamine Metabolism in Cancer : Understanding the Heterogeneity ». In : *Trends in Cancer* 3.3 (2017), p. 169-180. DOI : [10.1016/j.trecan.2017.01.005](https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.01.005) (cité page 131).

- [205] Tamer N. JARADA, Jon G. ROKNE et Reda ALHAJJ. « A review of computational drug repositioning : strategies, approaches, opportunities, challenges, and directions ». In : *Journal of Cheminformatics* 12.1 (2020). DOI : [10.1186/s13321-020-00450-7](https://doi.org/10.1186/s13321-020-00450-7) (cité page 131).
- [206] Angelika BUCZYŃSKA et al. « Metformin Intervention—A Panacea for Cancer Treatment? » In : *Cancers* 14.5 (2022), p. 1336. DOI : [10.3390/cancers14051336](https://doi.org/10.3390/cancers14051336) (cité page 131).
- [207] Frédéric BOST et Jean-François TANTI. « Metformine et cancer : repositionnement ou non ? ... La question se pose ». In : *Médecine des Maladies Métaboliques* 15.4 (2021), p. 408-412. DOI : [10.1016/j.mmm.2021.04.008](https://doi.org/10.1016/j.mmm.2021.04.008) (cité aux pages 131, 132).
- [208] Shivendra Vikram SINGH et al. « Metformin induced lactic acidosis impaired response of cancer cells towards paclitaxel and doxorubicin : Role of monocarboxylate transporter ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1867.3 (2021), p. 166011. DOI : [10.1016/j.bbadis.2020.166011](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.166011) (cité page 132).
- [209] Jun DENG et al. « Novel application of metformin combined with targeted drugs on anticancer treatment ». In : *Cancer Science* 110.1 (2018), p. 23-30. DOI : [10.1111/cas.13849](https://doi.org/10.1111/cas.13849) (cité page 132).
- [210] Robert J. GILLIES et al. « Targeting acidity in cancer and diabetes ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1871.2 (2019), p. 273-280. DOI : [10.1016/j.bbcan.2019.01.003](https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.01.003) (cité page 132).
- [211] Catherine Bjerre COLLIN et al. « Computational Models for Clinical Applications in Personalized Medicine—Guidelines and Recommendations for Data Integration and Model Validation ». In : *Journal of Personalized Medicine* 12.2 (2022), p. 166. DOI : [10.3390/jpm12020166](https://doi.org/10.3390/jpm12020166) (cité page 132).
- [212] Carla MOTTINI et al. « Computer-aided drug repurposing for cancer therapy : Approaches and opportunities to challenge anticancer targets ». In : *Seminars in Cancer Biology* 68 (2021), p. 59-74. DOI : [10.1016/j.semancer.2019.09.023](https://doi.org/10.1016/j.semancer.2019.09.023) (cité page 132).
- [213] Pierre JACQUET et Angélique STÉPHANOU. « Metabolic Reprogramming, Questioning, and Implications for Cancer. » In : *Biology* 10 (2 fév. 2021). DOI : [10.3390/biology10020129](https://doi.org/10.3390/biology10020129) (cité page 133).
- [214] Alaa TAFECH. « Characterization of the intracellular acidity regulation of brain tumor cells in fluorescence imaging - Consequences for therapeutic optimization of temozolomide ». Thèse de doct. 2022 (cité page 183).

