

## Utiliser le xénon pour l'étude de la barrière hémato-encéphalique ?

**Résumé** La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une interface hautement sélective entre le sang et le système nerveux central. L'étude de sa perméabilité représente un enjeu majeur en santé car elle est un frein à l'entrée de médicaments ayant pour cible le cerveau. Le xénon, gaz rare soluble dans les milieux biologiques et traversant la BHE, possède des propriétés intéressantes permettant de l'utiliser comme sonde en résonance magnétique nucléaire. Non seulement sa polarisation nucléaire, donc sa sensibilité de détection, peut être multipliée par plusieurs ordres de grandeur, mais il possède une large gamme de déplacements chimiques. Cet article propose d'évaluer l'utilisation du xénon comme marqueur de la perméabilité de la BHE grâce à une étude en trois temps : sur une suspension cellulaire exprimant un des transporteurs impliqués dans le blocage de l'entrée des médicaments, sur des barrières modèles obtenues via des cultures cellulaires, et enfin par des expériences sur rongeurs.

**Mots-clés** Biomarqueur, barrière hémato-encéphalique, xénon, RMN, hyperpolarisation, méthodologie.

**Abstract** Using xenon for the study of the blood brain barrier?

The blood-brain barrier (BBB) is a highly selective interface between the blood and the central nervous system. Studying its permeability is a major healthcare challenge, as it hinders the entry of drugs targeting the brain. Xenon, a noble gas that is soluble in biological media and crosses the BBB, possesses interesting properties that enable it to be used as a nuclear magnetic resonance spy. Not only can its nuclear polarization, and hence its detection sensitivity, be multiplied by several orders of magnitude, but it also has a wide chemical shift range. This article aims to evaluate the use of xenon as a marker of BBB permeability through a three-stage study: on a cell suspension expressing one of the transporters involved in blocking drug entry, on model barriers obtained via cell cultures, and finally experiments on rodents.

**Keywords** Biomarker, blood-brain barrier, xenon, NMR, hyperpolarization, methodology.

### Le xénon pour les études biologiques

C'est à la toute fin du XIX<sup>e</sup> siècle, en 1898, que deux chimistes britanniques, William Ramsay et Morris Travers, découvrent un élément chimique inconnu jusqu'alors : le xénon. L'étymologie de ce mot vient du grec « xenos », signifiant « étranger », puisque cet élément, appartenant à la famille des gaz rares, est l'un des éléments les plus rares sur Terre même s'il y est présent naturellement.

De nombreuses caractéristiques de ce gaz le rendent attractif, que ce soit en médecine, en biologie médicale ou pour des études physico-chimiques. Par exemple, son utilisation en tant qu'anesthésiant chez l'homme est autorisée depuis 2007 dans la Communauté européenne. Depuis 2008, la société Air Liquide commercialise non seulement un mélange xénon-oxygène dans ce but (LENOXe™), mais aussi le respirateur spécifique. Seul le coût de revient de cette approche, dix fois plus élevé que celui de l'anesthésie au protoxyde d'azote, limite son expansion. Il connaît néanmoins des avantages certains, notamment au niveau de la vitesse d'endormissement ainsi que du confort de réveil des patients.

En tout état de cause, cela signifie que ce gaz rare, non nocif pour l'environnement, n'est pas si inerte que cela. Si on s'intéresse à sa chimie, on lui connaît même des composés covalents : XeF<sub>6</sub> (agent fluorant puissant), XeO<sub>4</sub>, XeO<sub>6</sub> parmi d'autres. Mais même l'espèce monoatomique est intéressante. Depuis le début du XXI<sup>e</sup> siècle, des laboratoires de recherche en font une application précieuse en imagerie anatomique, pour visualiser les régions pauvres en hydrogène, tels les poumons [1]. Cette imagerie de résonance magnétique (IRM) particulière, qui nécessite une augmentation drastique préalable du signal par des techniques d'hyperpolarisation de spin

(voir plus loin), a l'avantage d'être totalement inoffensive. Le patient inhale une bouffée de xénon avant que l'image soit acquise en quelques secondes. Ce type d'image possède la signature de la pathologie pulmonaire du patient ; il est possible de reconnaître des personnes atteintes de mucoviscidose parmi celles souffrant d'asthme, d'emphysème, etc. [2]. Évidemment, cette approche a récemment été employée pour étudier les effets pulmonaires du Covid sur des patients [3].

La tomographie au xénon, dans laquelle là aussi le sujet inhale du gaz xénon pendant la réalisation d'images par rayons X, est quant à elle précieuse en neuroimagerie où elle délivre une mesure quantitative du débit sanguin cérébral [4]. Dans le domaine de la biologie, le xénon a été utilisé pour mettre en évidence et cartographier les cavités hydrophobes de protéines, qui ont été démontrées comme ayant un rôle fondamental dans la thermodynamique de l'activité enzymatique. L'outil tout d'abord employé a été la diffraction de rayons X sous pression de gaz rare [5]. Ensuite, c'est la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), utilisant là encore du xénon hyperpolarisé, qui a été employée [6].

Avec cette approche, il a pu aussi être montré que le gaz rare présentait des signaux différents entre l'intérieur et l'extérieur des cellules biologiques [7]. La distinction spectrale entre ces deux environnements permet d'évaluer la vitesse de passage du xénon à travers la membrane plasmique, et donc donne accès à des informations de fluidité et de perméabilité de celle-ci.

Ce ne sont là que quelques applications. D'une manière générale, le xénon est un traceur diffusif qui peut être rendu très « lumineux » pour la RMN et susceptible de fournir des informations riches sur les milieux qu'il rencontre. Au sein d'un projet regroupant des chercheurs du CEA, en nous basant sur

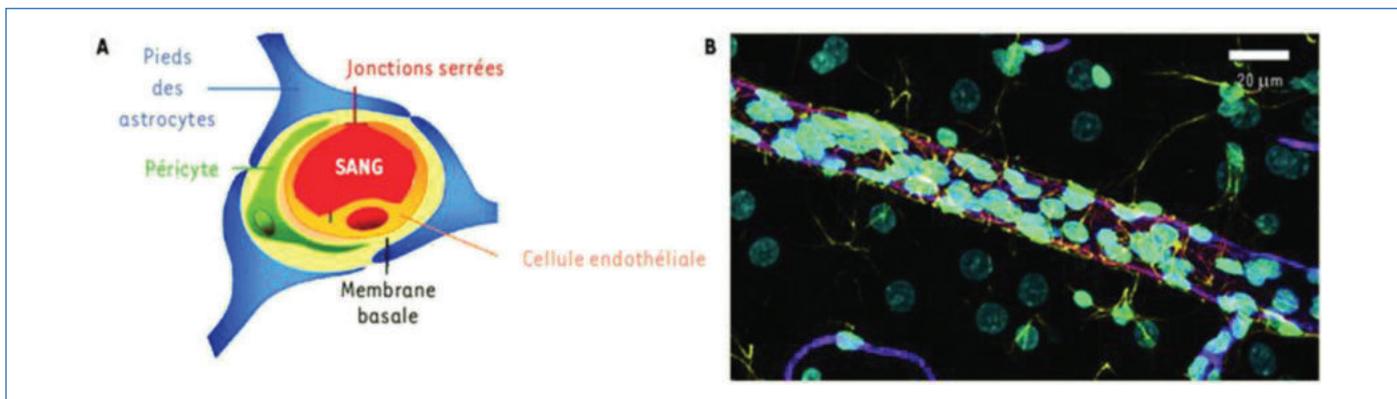


Figure 1 - A) Schéma d'un capillaire cérébral en coupe transversale montrant les différentes structures cellulaires composant la BHE. B) Visualisation par microscopie confocale d'un vaisseau cérébral dans le cortex chez le rat. Les astrocytes sont révélés par un immunomarquage de la GFAP (« glial fibrillary acidic protein ») (en jaune) et la membrane luminaire des cellules endothéliales par un immunomarquage de la P-glycoprotéine (en magenta). Les noyaux cellulaires (cellules endothéliales, cellules murales, neurones, cellules gliales) sont marqués par un intercalant de l'ADN (en cyan) [8].

ses propriétés, nous étudions la possibilité d'utiliser le xénon comme sonde de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique.

## La barrière hémato-encéphalique

### Rôle et structure

La barrière hémato-encéphalique (BHE) séparant le sang du système nerveux central est connue depuis peu de temps. La preuve définitive de son existence n'a été apportée qu'en 1967 suite à des expériences en microscopie électronique en transmission, bien que Paul Ehrlich ait mené des expériences ayant indiqué l'existence de cette barrière en 1885 (les résultats avaient alors été mal interprétés).

Cette barrière est composée de cellules endothéliales reliées les unes aux autres par des jonctions serrées, des péricytes et des astrocytes ayant pour but de fournir les nutriments nécessaires et de réguler l'environnement chimique du système nerveux central (figure 1). La BHE va ainsi bloquer le passage des agents pathogènes et autres molécules indésirables pour le cerveau, tout en laissant entrer les éléments indispensables à son fonctionnement.

Sa principale fonction est de garantir l'intégrité et le bon fonctionnement du cerveau grâce à sa haute sélectivité. Mais cette barrière s'avère être un frein majeur à l'entrée de médicaments ayant pour cible le cerveau.

### Transport au travers de la barrière hémato-encéphalique

Le passage des molécules de part et d'autre de la BHE se fait de deux manières différentes en fonction de leur nature chimique ainsi que de leur taille. La diffusion peut être passive ou active. Les petites molécules hydrophobes peuvent ainsi traverser la BHE de manière passive en traversant la bicouche phospholipidique constitutive de la membrane plasmique. Les molécules hydrophiles ou de plus grande taille doivent, elles, être prises en charge par des protéines membranaires spécifiques ; on dit que la diffusion est active.

Parmi les différentes protéines membranaires, existent deux grands types de transporteurs : les transporteurs SLC qui permettent de faire passer les molécules du système sanguin vers le système nerveux, et les transporteurs ABC, aussi appelés pompes d'efflux, qui vont quant à eux intercepter les molécules qui seraient rentrées par diffusion passive pour les rejeter dans le système sanguin et les empêcher de passer dans le cerveau.

C'est parmi les transporteurs ABC que l'on trouve la principale raison du rejet des médicaments ayant pour cible le cerveau, comme c'est le cas de ceux traitant les maladies neurodégénératives ou les tumeurs cérébrales. Étant donné que de nombreux candidats médicaments potentiels sont disponibles, la problématique actuelle n'est pas tant de trouver des médicaments pour guérir ces maladies mais de leur permettre d'atteindre leur cible. En effet, de nombreux candidats donnent des résultats prometteurs lorsqu'ils sont utilisés directement sur les neurones dans des modèles *in vitro*, mais sont inefficaces sur les modèles *in vivo* car ils ne sont pas en mesure d'atteindre les protéines ciblées puisque rejetés par les pompes d'efflux.

### Pourquoi l'étudier au moyen de la RMN du xénon ?

Il existe différentes manières d'étudier cette barrière ou d'essayer d'influer sur sa perméabilité.

Certaines méthodes visent à étudier la barrière à l'aide d'éléments radiomarqués en utilisant la tomographie à émission de positons (TEP) [9] ou des modalités d'imagerie complémentaires telles que la TEP/IRM (figure 2). Cette modalité permet de situer plus facilement les zones de fixation des éléments radiomarqués comme le carbone 11 ou le gadolinium. Ces études sont souvent basées sur une encapsulation du radiomarqueur, permettant de le lier à un substrat des pompes d'efflux, mais aussi de protéger le plus possible l'organisme de la toxicité de ces éléments. Cela permet d'observer si le substrat passe en plus grande quantité et s'il reste plus longtemps dans le tissu nerveux [10]. Ces méthodes visent à être ou sont utilisées en clinique.

D'autres études sont menées en préclinique à l'aide d'ultrasons. Dans ces expériences, l'idée est de réussir à ouvrir un passage pour les médicaments potentiels directement dans la barrière en utilisant des ondes localisées de manière extrêmement précise [12-13].

Enfin, en préclinique, d'autres méthodes visent à étudier la barrière pour obtenir des informations plus théoriques sans utiliser de modalité d'imagerie, en se concentrant directement sur l'étude du passage au travers de cette dernière via des études anatomiques du cerveau. Par exemple, une perfusion cérébrale permet d'observer la vitesse de pénétration de diverses molécules dans le système nerveux central ou l'injection de colorants permet d'étudier des lésions naturelles ou provoquées au niveau de la BHE [14].

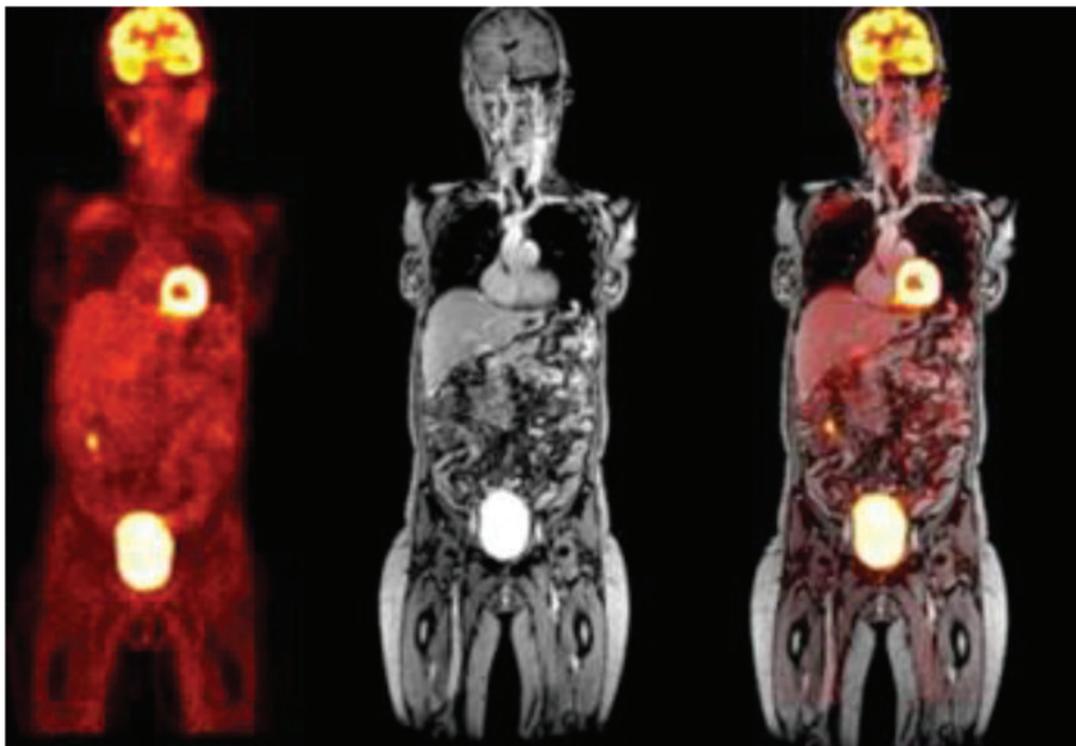


Figure 2 - Exemple de combinaison des modalités TEP/IRM : TEP à gauche, IRM  $^1\text{H}$  au milieu, fusion des deux modalités à droite [11].

Dans notre étude, il s'agit à la fois de comprendre les effets éventuels du xénon sur la BHE et d'utiliser la RMN du xénon-129 hyperpolarisé pour observer l'effet de certains médicaments sur le comportement de cette barrière.

### Résonance magnétique nucléaire du xénon-129

La résonance magnétique nucléaire (RMN), qui a fait l'objet d'un numéro spécial de *L'Actualité Chimique* il y a une dizaine d'années [15], permet l'analyse fine de la matière par l'observation de transitions de moments magnétiques nucléaires (spins nucléaires). L'énergie d'interaction entre ces moments magnétiques et un champ magnétique externe (communément noté  $B_0$ ) étant très faible – les longueurs d'onde mises en œuvre sont de l'ordre du mètre, les fréquences sont dans le domaine radio (MHz) –, on a affaire à une technique peu invasive et qui permet une analyse en profondeur de la matière. Mais surtout, en fonction des densités électroniques autour du noyau observé, une réponse en énergie au champ  $B_0$  différente apparaît. C'est la notion de déplacement chimique qui est ainsi la plus utile au chimiste, bien que le retour à l'équilibre de l'aimantation après perturbation par un champ  $B_1$  oscillant à la fréquence de Larmor  $\nu_0 = \gamma B_0$  ( $\gamma$  étant le rapport gyromagnétique), c'est-à-dire la relaxation, soit aussi très informative.

Si l'on considère le xénon, celui-ci possède un large nuage électronique, facilement polarisable, et donc la moindre déformation de celui-ci se traduit par une variation significative de ses paramètres RMN : déplacement chimique, temps de relaxation. Par exemple, une gamme de déplacements chimiques de plus de 350 ppm a été répertoriée dans la littérature !

De plus, l'isotope 129 est de spin nucléaire 1/2 (deux niveaux d'énergie en présence d'un champ magnétique) ; il possède un rapport gyromagnétique proche de celui du carbone 13

et son abondance naturelle est de 26 %<sup>(1)</sup>. Ainsi il n'est pas trop difficile à étudier par RMN et est susceptible de représenter une sonde précieuse des milieux avec lesquels il interagit. Il possède aussi des avantages autres que ceux énumérés auparavant :

- il est très soluble dans les lipides, relativement soluble dans l'eau (4,5 mM par bar), et donc s'accommode bien des milieux biologiques ;
  - il se manipule facilement, puisqu'il peut être condensé dans l'azote liquide à 77 K, et qu'il peut être évaporé très facilement.
- Cependant, les faibles énergies rencontrées en RMN sont un avantage, mais aussi un inconvénient. En effet, les spins nucléaires sont des fermions, et en tant que tels ils obéissent à la distribution de Boltzmann. Le rapport de population des niveaux d'énergie spins 1/2 s'écrit donc :

$$\frac{n_{\uparrow}}{n_{\downarrow}} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right) \quad (1)$$

où  $k$  est la constante de Boltzmann,  $T$  la température absolue en Kelvin.

En combinant cette équation, l'équation de Larmor et l'équation de Planck-Einstein propre à chaque spectroscopie  $\Delta E = h\nu$ , on parvient à la formule de la polarisation nucléaire :

$$P = \frac{n_{\downarrow} - n_{\uparrow}}{n_{\downarrow} + n_{\uparrow}} = \tanh\left(\frac{\gamma\hbar B_0}{2kT}\right) \quad (2)$$

où  $\hbar$  est la constante de Planck divisée par  $2\pi$ <sup>(2)</sup>.

Le signal RMN étant lié à l'aimantation nucléaire  $M$  :

$$M = \frac{\gamma\hbar}{2} (n_{\downarrow} + n_{\uparrow})P = (n_{\downarrow} - n_{\uparrow}) \frac{\gamma^2 \hbar^2 B_0}{4kT} \quad (3)$$

On comprend donc qu'à concentration fixe, il est d'autant plus grand que le champ magnétique  $B_0$  est élevé et que la température  $T$  est basse. Mais si on met des nombres derrière ces formules, on s'aperçoit que la polarisation du xénon-129

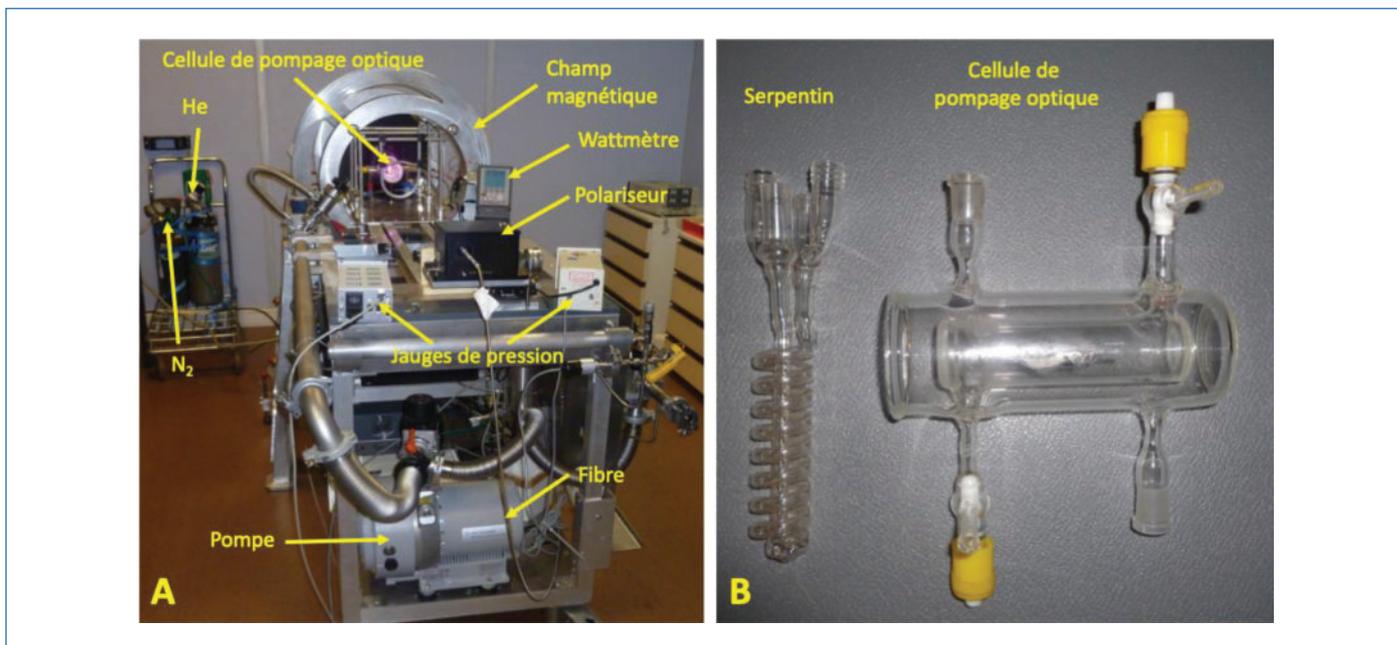


Figure 3 - Pompage optique du xénon au CEA Saclay : A) montage expérimental avec indication des principaux éléments ; B) détail de la cellule de pompage optique à double enveloppe (permettant son chauffage par utilisation d'un courant d'azote) et du serpentin de stockage du xénon.

est de  $10^{-5}$  même dans un champ magnétique de 11,7 Tesla. Autrement dit, un excès de 1 sur 100 000 pour la population des spins dans l'état de basse énergie !

### Hyperpolarisation du xénon

Une solution pour pallier le manque de sensibilité de la RMN consiste à transférer vers les noyaux la polarisation de systèmes plus ordonnés que les spins nucléaires, tels les spins électroniques ou les photons. En particulier deux méthodes se sont révélées efficaces pour hyperpolariser le xénon : la polarisation dynamique nucléaire (DNP en anglais) et le pompage optique par échange de spin (SEOP en anglais).

#### Polarisation dynamique nucléaire

La DNP de dissolution est basée sur le transfert de polarisation à une température voisine de 1 K des spins électroniques de centres paramagnétiques incorporés dans une matrice vitreuse vers les spins nucléaires voisins. Pour que la technique soit efficace, ces paramagnétiques, généralement des radicaux stables, doivent être répartis de manière homogène dans la solution gelée contenant les molécules d'intérêt, et l'étape de réchauffement pour obtenir une solution hyperpolarisée doit être rapide. A. Comment et ses collaborateurs ont proposé d'utiliser une sublimation du xénon hyperpolarisé par une telle méthode, de manière à le séparer rapidement de la solution contenant les radicaux [17].

#### Pompage optique par échange de spin

Le pompage optique, basé sur le transfert du moment angulaire d'un faisceau de photons vers les moments magnétiques électroniques, a valu à Alfred Kastler son prix Nobel en 1950 [18]. C'est à partir des années 1960 qu'il permit d'augmenter drastiquement la polarisation nucléaire [19].

Dans la méthode d'échange de spin, une cellule de verre contenant des vapeurs de métal alcalin et un gaz rare en plus grande quantité est illuminée par un faisceau de photons polarisés circulairement et de longueur d'onde correspondant à la transition entre l'état fondamental et le premier état excité

de l'alcalin (transition D1), en présence d'un champ magnétique colinéaire au faisceau. Près de la moitié du moment angulaire de spin des photons absorbés est transférée aux atomes de l'alcalin, ce qui polarise le spin des électrons de valence de celui-ci. Ce transfert de polarisation photon-électron est très efficace et très rapide. Ensuite, par des collisions inter-atomiques, une partie de la polarisation électronique de l'alcalin est transférée sur les spins nucléaires du xénon. Ce phénomène, moins efficace, prend quelques minutes.

Pour réaliser un montage de pompage optique par échange de spin, il faut donc une source laser de puissance à la longueur d'onde de la transition D1 de l'alcalin, polariser la lumière circulairement au moyen de lames quart d'onde, remplir une cellule avec quelques gouttes de l'alcalin, le gaz rare à polariser, et un ou des gaz tampons (afin d'augmenter la pression dans la cellule et d'éviter la désexcitation radiative), puis la chauffer afin de vaporiser l'alcalin. Enfin, il est important d'avoir un champ magnétique colinéaire au faisceau lumineux, afin de lever la dégénérescence des niveaux de spin électronique. Un tel montage a été réalisé au CEA Saclay (voir figure 3).

Après quelques minutes de pompage optique, on collecte le xénon hyperpolarisé en le séparant des autres éléments chimiques gazeux (azote, hélium), par condensation dans l'azote liquide, et son hyperpolarisation est maintenue pendant des temps assez longs. Dans l'azote liquide, le temps de maintien de l'hyperpolarisation peut être de plusieurs heures, à condition qu'il y ait un champ magnétique. Le résultat après réchauffement, pour la phase gaz en champ magnétique homogène, est donné en figure 4.

#### Spécificité de la RMN des noyaux hyperpolarisés

Quelle que soit la méthode de production utilisée, l'hyperpolarisation est un état transitoire : l'aimantation revient plus ou moins rapidement à son état d'équilibre, donné par la distribution de Boltzmann, sous l'effet de la relaxation ou des impulsions radiofréquence de la séquence RMN. Par exemple, après une impulsion d'angle  $90^\circ$  destinée à basculer l'aimantation de l'axe z dans le plan transversal xy afin de la détecter, les

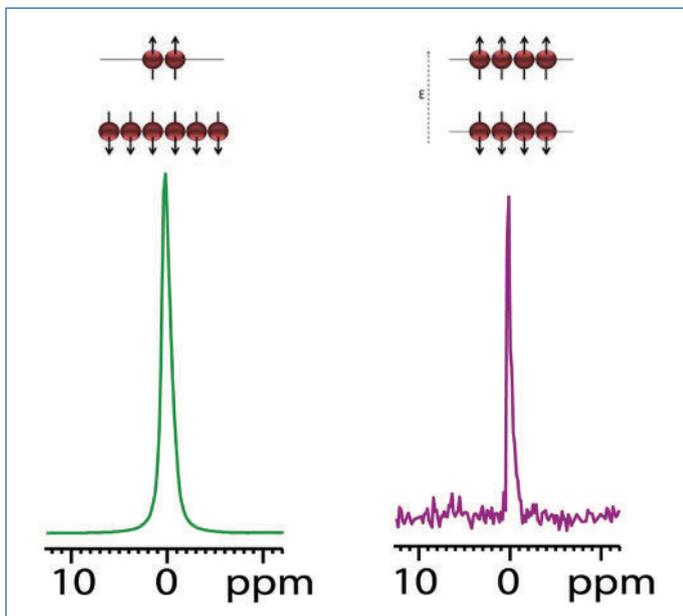


Figure 4 - Résultat en phase gaz à 11,7 Tesla (environ 1 bar de xénon dans le tube RMN). À gauche : spectre RMN  $^{129}\text{Xe}$  obtenu après pompage optique, en un passage. À droite : spectre RMN  $^{129}\text{Xe}$  sur le même échantillon après dépolarisation. Ce spectre a nécessité 16 heures d'acquisition et 32 scans. Un gain en signal d'un facteur 45 000 est obtenu.

populations des deux niveaux d'énergie de spin nucléaire sont égalisées. Ainsi, bien que le signal RMN soit maximal, toute l'hyperpolarisation est perdue en un coup.

C'est pourquoi toutes les séquences RMN utilisées classiquement ne sont pas souhaitables pour les espèces hyperpolarisées. Une stratégie basée d'une part sur des séquences rapides utilisant de manière optimisée l'hyperpolarisation, d'autre part sur une synchronisation avec le renouvellement en xénon hyperpolarisé frais, est préconisée.

### Méthodologie autour de l'évaluation du $^{129}\text{Xe}$ comme marqueur de la perméabilité de la BHE

Soluble dans les milieux biologiques, de petite taille, le xénon diffuse rapidement à travers les différentes barrières biologiques pour se répartir dans l'organisme. Les concentrations de répartition dépendent du système biologique étudié.

D'un point de vue RMN, une fois dans le milieu biologique, le xénon-129 conserve son hyperpolarisation suffisamment longtemps pour être observé. Dans le sang, le T1 est de 5 à 7 secondes. Plusieurs stratégies d'étude s'offrent alors pour caractériser le passage du xénon d'un compartiment A vers un compartiment B à travers les barrières biologiques (parmi lesquelles la BHE) (figure 5) :

- Soit les signaux du xénon dans les deux compartiments sont différenciables sur un spectre RMN unique par un déplacement chimique différent et l'étude de chaque compartiment se fait par une sélection spectrale [20]. Pour cela, des impulsions sélectives en fréquence peuvent permettre de n'exciter qu'un seul des deux signaux. Pour que deux compartiments soient différenciables grâce au déplacement chimique, il faut que les milieux A et B aient des compositions chimiques différentes et que la résolution spectrale, donnée par l'intensité du champ magnétique délivré par le spectromètre ainsi que par la structure de l'échantillon étudié, soit suffisante.

- Soit le xénon dans les compartiments A et B présente un déplacement chimique unique et on le localise en utilisant une sélection spatiale. Les cinétiques d'évolution du xénon dans les deux compartiments sont alors étudiées séparément. Pour réaliser cette sélection spatiale, des techniques d'imagerie basées sur l'emploi de gradients de champ magnétique combinées à des impulsions sélectives en fréquence sont développées.

### Étude de cellules en suspensions : cas de la sélection spectrale

Le premier cas d'étude a été des suspensions cellulaires. En effet, ce type d'échantillon permet de garantir une bonne résolution spectrale ainsi qu'une bonne sensibilité de détection. Des cellules LR73 ont été transfectées avec le gène *mdr1* codant pour la P-glycoprotéine, une pompe à efflux présente dans la BHE. Il en résulte une surexpression de la P-glycoprotéine qui se trouve au niveau de la membrane plasmique des cellules.

En présence de la suspension cellulaire, le spectre RMN du xénon-129 présente deux signaux : le premier à 198 ppm correspondant au xénon dans le milieu extracellulaire, et un deuxième vers les 200 ppm correspondant au xénon dans les cellules. Il est donc possible d'inverser sélectivement un des

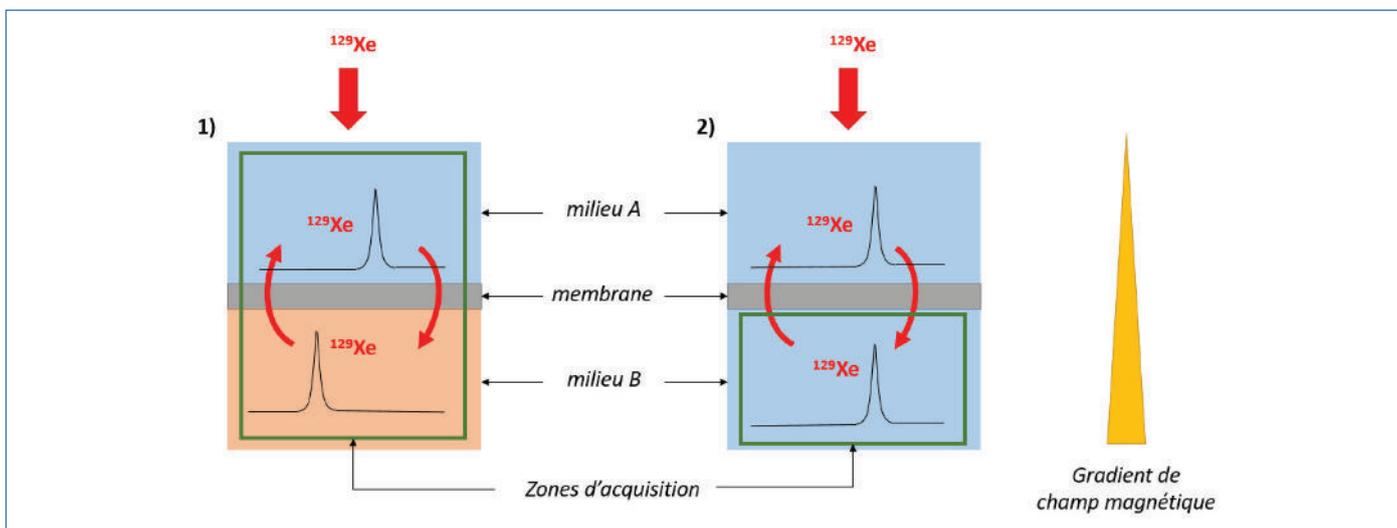


Figure 5 - Schéma explicatif des deux stratégies d'étude : 1) cas de la sélection spectrale : les spectres RMN en  $^{129}\text{Xe}$  dans les compartiments A et B ont des déplacements chimiques différents ; 2) cas de la sélection spatiale : les déplacements chimiques sont identiques, les deux compartiments sont différenciés grâce à l'utilisation d'un gradient de champ magnétique permettant de définir une zone d'acquisition.

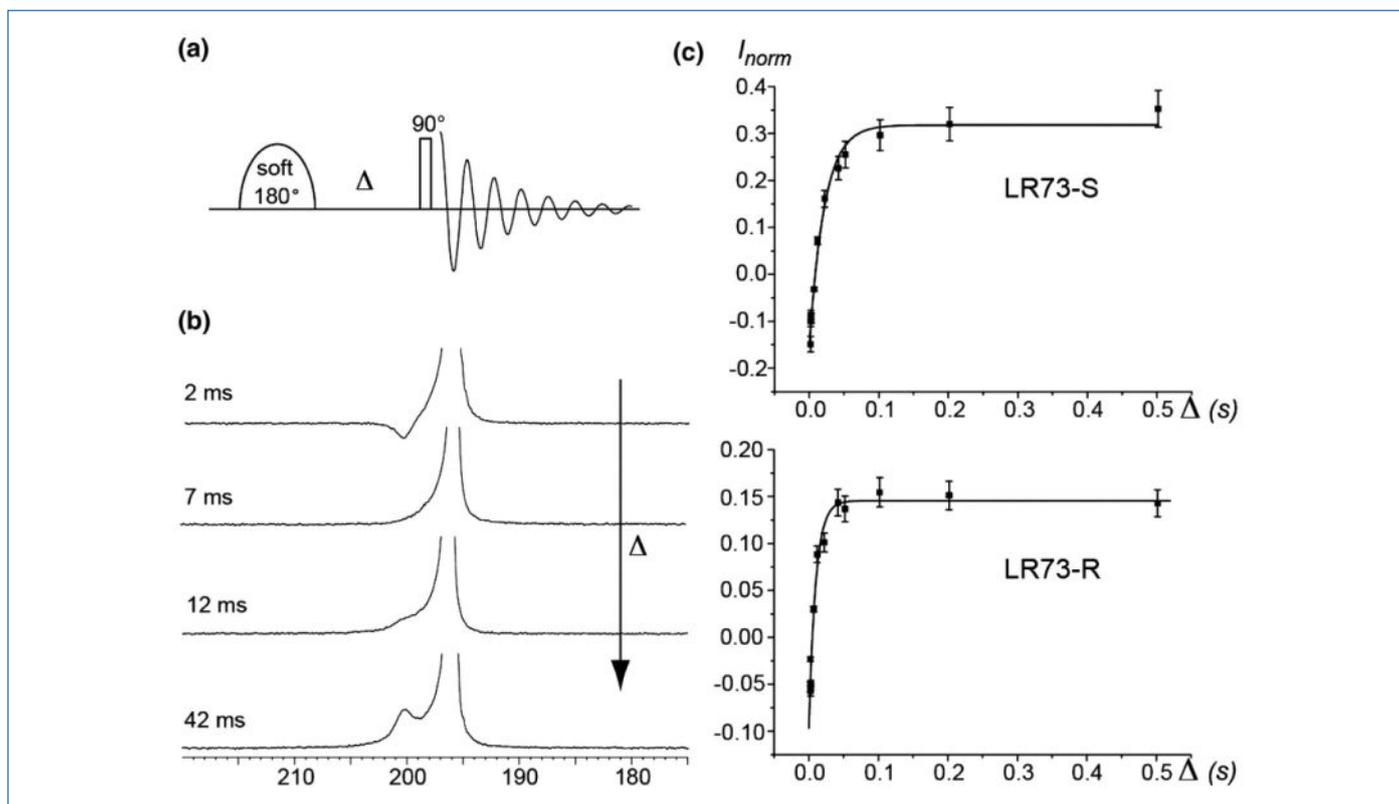


Figure 6 - Expérience de RMN  $^{129}\text{Xe}$  réalisée sur des suspensions cellulaires, permettant la mesure de la vitesse de passage du xénon à travers la membrane plasmique. a) La séquence RMN consiste en une inversion sélective du signal de xénon intracellulaire suivie par un délai  $\Delta$  et une impulsion  $90^\circ$  non sélective précédant l'acquisition ; b) des spectres à différents délais  $\Delta$  pendant lequel le xénon diffuse sont enregistrés ; c) en traçant l'intégrale du signal inversé en fonction de  $\Delta$ , on obtient l'information sur la vitesse d'échange. Ceci, appliqué sur des cellules natives (LR73-S) et surexprimant la P-glycoprotéine (LR73-R), montre une vitesse de sortie du xénon beaucoup plus grande avec ces dernières. (D'après [21]).

deux signaux (qui correspond donc à un des deux compartiments) et de regarder la vitesse de retour à l'équilibre qui dépend, elle, de la vitesse d'échange entre les compartiments intra- et extracellulaires (figure 6).

La vitesse d'entrée du xénon dans les cellules est indépendante de la présence de la P-glycoprotéine. Par contre, la vitesse de sortie du xénon est multipliée par trois dans le cas des cellules surexprimant la pompe à efflux. L'incubation des cellules avec la cyclosporine-A, un révertant de la P-glycoprotéine, inhibe cette différence et les vitesses de sorties deviennent identiques [21].

Ces premières expériences ont donc permis de montrer que l'utilisation de la RMN du xénon hyperpolarisé s'avère prometteuse pour l'analyse de systèmes biologiques à perméabilité variable impliquant des pompes à efflux comme la P-glycoprotéine.

#### Étude de BHE modèles sur membrane : cas de la sélection spatiale

Les études *in vivo* sont régies par la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) [22]. Cette règle vise à améliorer les conditions d'expérimentation animale. L'idée est de remplacer au maximum les études *in vivo* par des études *in vitro*, de réduire le nombre d'expériences devant être menées *in vivo* quand les modèles *in vitro* ne sont pas suffisants, et enfin de s'assurer le mieux possible d'une reproductibilité des résultats. Comme dit précédemment, cette règle impose un remplacement des expériences sur les animaux par des modèles *in vitro* lorsque cela est possible. Il est donc obligatoire d'effectuer de premières études sur des modèles de BHE avant de passer aux expériences sur rongeur. Le modèle de BHE est obtenu en faisant pousser des cellules endothéliales sur une membrane

poreuse et ensemencant le compartiment basal avec des astrocytes afin de recréer l'environnement chimique du système nerveux central. On retrouve ainsi une structure 3D similaire à celle *in vivo*.

Afin de réaliser la cinétique en RMN  $^{129}\text{Xe}$ , le dispositif décrit en figure 7 est placé dans le spectromètre RMN entre les bobines radiofréquences. Le xénon hyperpolarisé est dissous dans le milieu apical via une membrane d'échange. Il diffuse ensuite à travers la BHE pour se retrouver dans le milieu basal. La composition chimique des deux milieux n'étant pas très différente, la signature spectrale des deux compartiments devrait être identique (figure 5, cas 2). Les informations concernant la fluidité de la barrière seront donc contenues dans la cinétique de passage du xénon du compartiment apical vers le compartiment basal. Plus la barrière sera perméable, plus le xénon passera rapidement.

Ce type d'expérience nécessite le développement de séquences RMN permettant une utilisation optimale de l'hyperpolarisation du xénon, ainsi qu'une sélection spatiale de la zone d'acquisition afin de ne considérer que celle d'intérêt. L'objectif est de tester différents modulateurs de la perméabilité de la BHE et de corrélérer les modifications ainsi induites avec les résultats en RMN du xénon. Il sera ainsi possible d'évaluer la capacité du xénon à être un bon marqueur de la perméabilité de la BHE sur un modèle *in vitro*.

#### Étude par RMN du $^{129}\text{Xe}$ de la BHE *in vivo*

Les études *in vivo* sur rongeurs seront ensuite réalisées. Pour ce faire, après anesthésie, l'animal sera placé dans un berceau chauffé et sa tête sera placée au niveau des bobines radiofréquences. Le xénon hyperpolarisé sera délivré à l'animal à l'aide d'un masque. L'animal respirera ainsi spontanément le gaz.

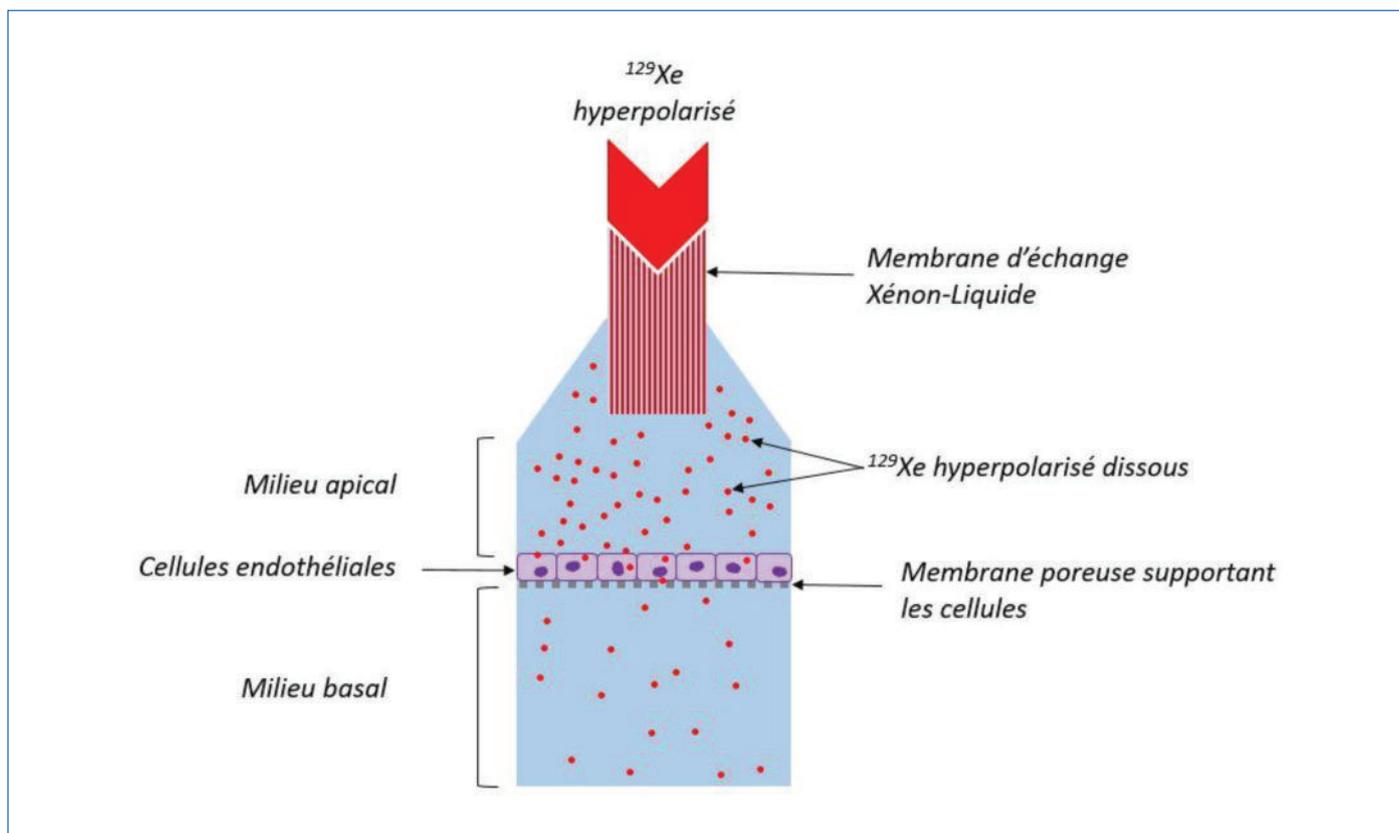


Figure 7 - Principe du dispositif permettant l'étude par RMN/IRM du xénon-129 hyperpolarisé de modèles de BHE. Le xénon hyperpolarisé est dissous dans le milieu apical en passant à travers une membrane d'échange. Puis il diffuse à travers la couche de cellules endothéliales constituant la BHE pour se retrouver dans le milieu basal où le signal RMN du  $^{129}\text{Xe}$  est enregistré grâce à une sélection spatiale.

Le xénon traversera la barrière alvéo-capillaire, diffusera dans l'organisme via la circulation sanguine pour finalement traverser la BHE et être détectable dans le cerveau de l'animal.

La différence de composition chimique entre le sang et la zone cérébrale est suffisamment importante pour induire deux déplacements chimiques différents (figure 5, cas 1). Mais il sera indispensable d'évaluer si l'hétérogénéité de champ magnétique induite par l'animal permettra de séparer spectralement les deux zones ou si celles-ci seront confondues sur le spectre RMN.

Il est certain que la respiration de l'animal sera un avantage certain par rapport aux expériences *in vitro*. Celle-ci permettra à chaque inspiration du rongeur de renouveler le xénon hyperpolarisé dans l'organisme, et donc d'augmenter la sensibilité ainsi que de poursuivre les études dans le temps.

Afin de déterminer si la RMN du xénon hyperpolarisé est un bon candidat pour évaluer *in vivo* la perméabilité de la BHE, de nombreux paramètres expérimentaux devront être étudiés et optimisés : l'administration du xénon, les séquences d'impulsions jusqu'au traitement des résultats.

### Le xénon : observateur ou acteur ?

Le xénon est donc une sonde très intéressante pour l'étude de la barrière hémato-encéphalique. Sa propension à interagir avec les différents milieux biologiques qui l'entourent et la possibilité d'augmenter son signal RMN de plusieurs ordres de grandeur combinées à sa grande gamme de déplacements chimiques permettent une approche différente de la RMN habituelle. La possibilité d'obtenir des cinétiques de passage du xénon au travers des membranes plasmiques et de le localiser quantitativement pourrait ouvrir la voie à une

meilleure étude de la BHE et de son intégrité, que ce soit en palliatif ou pour déterminer des facteurs précurseurs du déclenchement de certaines maladies telles que les maladies neurodégénératives.

Si le xénon est utile dans cette idée d'amélioration des diagnostics cliniques, il est aussi intéressant pour une étude biologique. Il semblerait que ce gaz ait un effet sur la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Cet effet, sans doute lié à une action sur les pompes d'efflux, pourrait nous permettre d'agir et peut-être même de moduler la fluidité de cette barrière, ce qui serait un atout majeur pour permettre aux candidats médicamenteux, jusqu'ici repoussés par ces pompes, d'atteindre leur cible dans le système nerveux.

(1) Notons qu'il existe un autre isotope stable, le xénon-131 d'abondance naturelle 21%. Celui-ci est quadripolaire, c'est-à-dire de spin  $> 1/2$ . Étant très sensible aux gradients de champ électrique, il est surtout utilisé pour l'étude des surfaces [16].

(2) Le terme  $\tanh$  est négligé dans l'approximation des hautes températures, c'est-à-dire dans les conditions habituelles de la RMN, donnant  $P \approx \frac{\gamma h B_0}{2kT}$ .

[1] J.P. Mugler *et al.*, Simultaneous magnetic resonance imaging of ventilation distribution and gas uptake in the human lung using hyperpolarized xenon-129, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2010**, 107(50), p. 21707-712.

[2] M. Salerno *et al.*, Hyperpolarized noble gas MR imaging of the lung: potential clinical applications, *Eur. J. Radiol.*, **2001**, 40(1), p. 33-44.

[3] S. Chen *et al.*, Relationship between lung and brain injury in Covid-19 patients: a hyperpolarized  $^{129}\text{Xe}$ -MRI-based 8-month follow-up, *Biomedicine*, **2022**, 10(4), 781.

[4] H. Yonas, R.R. Pindzola, D.W. Johnson, Xenon/computed tomography cerebral blood flow and its use in clinical management, *Neurosurg. Clin. N. Am.*, **1996**, 7(4), p. 605-616.

[5] A. Lewit-Bentley *et al.*, Structure of tumour necrosis factor by X-ray solution scattering and preliminary studies by single crystal X-ray diffraction, *J. Mol. Biol.*, **1988**, 199(2), p. 389-392.

[6] H. Desvaux, J.G. Huber, T. Brotin, J.-P. Dutasta, P. Berthault, Magnetization transfer from laser-polarized xenon to protons with spin-diffusion quenching, *ChemPhysChem*, **2003**, 4(4), p. 384-387.

[7] C. Boutin *et al.*, Hyperpolarized  $^{129}\text{Xe}$  NMR signature of living biological cells, *NMR Biomed.*, **2011**, *24*(10), p. 1264-69.

[8] P. Lafaye, D. Lesuisse, X. Declèves, Améliorer le ciblage tissulaire des anticorps thérapeutiques par de nouveaux formats : l'exemple de la barrière hémato-encéphalique, *Médecine/Sciences*, **2019**, *35*, p. 1106-12.

[9] S. Auvity *et al.*, P-Glycoprotein (ABCB1) inhibits the influx and increases the efflux of  $^{11}\text{C}$ -metoclopramide across the blood-brain barrier: a PET study on nonhuman primates, *J. Nucl. Med.*, **2018**, *59*(10), p. 1609-15.

[10] I. Idy-Peretti, M.-O. Habert, A. Kas, Qu'apporte l'imagerie hybride TEP-IRM dans l'étude des pathologies neuro-dégénératives ?, *Bull. Acad. Natl. Méd.*, **2022**, *206*(1), p. 28-37.

[11] O. Humbert *et al.*, Imagerie TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG du cancer du sein : étude du comportement métabolique des différents phénotypes tumoraux et prédiction de la réponse tumorale à la chimiothérapie néoadjuvante, Thèse, Université de Bourgogne, **2015**.

[12] J. Wang *et al.*, Ultrasound-mediated blood-brain barrier opening: an effective drug delivery system for theranostics of brain diseases, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2022**, *190*, 114539.

[13] S.B. Raymond *et al.*, Ultrasound enhanced delivery of molecular imaging and therapeutic agents in Alzheimer's disease mouse models, *PLoS One*, **2008**, *3*(5), e2175.

[14] A. Fabulas-Da Costa, Utilisation de modèles in vitro de la barrière hémato-encéphalique dans les phases précoces du développement de médicaments, *Thèse de doctorat*, Artois, **2013** ([www.theses.fr/2013ART00410](http://www.theses.fr/2013ART00410)).

[15] La résonance magnétique nucléaire en chimie, *L'Act. Chim.*, **2012**, 364-365.

[16] S.K. Ahola, P. Ingman, R. Laatikainen, J. Sinkkonen, J. Jokisaari,  $^{21}\text{Ne}$  and  $^{131}\text{Xe}$  NMR study of electric field gradients and multinuclear NMR study of the composition of a ferroelectric liquid crystal, *J. Chem. Phys.*, **2018**, *149*(23), 234901.

[17] A. Comment *et al.*, Hyperpolarizing gases via dynamic nuclear polarization and sublimation, *Phys. Rev. Lett.*, **2010**, *105*(1), 018104.

[18] A. Kastler, Quelques réflexions à propos des phénomènes de résonance magnétique dans le domaine des radiofréquences, *Experientia*, **1952**, *8*(1), p. 1-9.

[19] M.A. Bouchiat, T.R. Carver, C.M. Varnum, Nuclear polarization in He 3 gas induced by optical pumping and dipolar exchange, *Phys. Rev. Lett.*, **1960**, *5*(8), p. 373-375.

[20] P.W. Kuchel, K. Kirk, D. Shishmarev, The NMR 'split peak effect' in cell suspensions: historical perspective, explanation and applications, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2018**, *104*, p. 1-11.

[21] P. Berthault, C. Boutin, Chapter 14: Biosensing and study of biological cells using hyperpolarized  $^{129}\text{Xe}$ , in *Hyperpolarized Xenon-129 Magnetic Resonance*, **2015**, p. 261-271.

[22] W.M.S. Russell, R.L. Burch, *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen, **1959**.

**François NGHIEM**\*<sup>1,2</sup>, doctorant, **Céline BOUTIN**<sup>3</sup>, chercheuse, **Aloïse MABONDZO**<sup>2</sup>, directeur de recherche, et **Patrick BERTHAULT**<sup>3</sup>, directeur de recherche.

<sup>1</sup>Nanosciences et innovation pour les matériaux, la biomédecine et l'énergie - DRF/IRAMIS (NIMBE), CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette.

<sup>2</sup>Laboratoire d'étude de l'unité neurovasculaire et innovation thérapeutique (LENIT), CEA, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette.

<sup>3</sup>Laboratoire de structure et dynamique par résonance magnétique (LSDRM - NIMBE), CEA, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette.

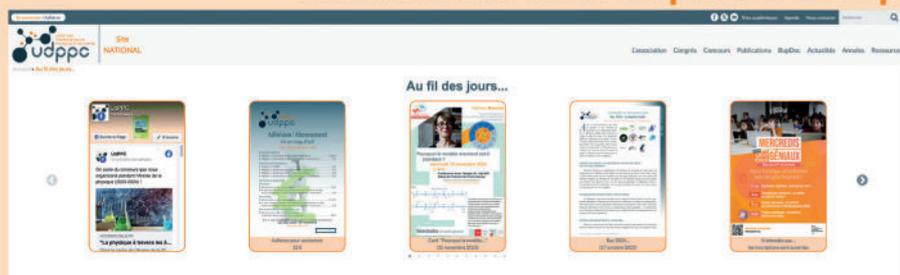
\* francois.nghiem@cea.fr



## L'Union des professeurs de physique et de chimie

Vous présente

son nouveau site : <http://www.udppc.asso.fr>



L'association	Actualités et Ressources
L'UdPPC ?, Nos positions, Tarifs,	De la maternelle au supérieur,
Charte graphique, Olympiades,	Au collège, Au lycée, Au labo
Partenaires, Nous soutenons, Enquêtes	Annales
Publications	Baccalauréats, Concours général, DNB
Le Bup, Nous avons lu,	Divers
L'arpenteur du web, Appel aux auteurs,	Agenda, BupDoc, Concours, Congrès,
Parus au BO, Autres publications, Publitaires	Réseaux sociaux, Sites académiques

mais l'UdPPC, c'est aussi...

...la publication numérique mensuelle avec impression papier trimestrielle



...la consultation du Bup en ligne par articles et par numéro avec BupDoc

Du 1<sup>er</sup> janvier au 31 décembre 2024 :

- ◆ Pour tous : 1907 → 2019
- ◆ Pour les abonnés : 2020 → 2024



...un congrès organisé chaque année par une académie différente



Siège social et courrier : 42 rue Saint-Jacques - 75005 PARIS  
Tél. : 01 40 46 83 80 - [secretariat.national@udppc.asso.fr](mailto:secretariat.national@udppc.asso.fr)

