

## La RMN, un couteau suisse pour disséquer la chimie cellulaire à toutes les échelles

**Résumé** Cet article présente deux développements récents sur la physico-chimie du vivant utilisant la résonance magnétique nucléaire : la structure des protéines en cellule et la détection d'activité enzymatique avec l'IRM d'agents de contrastes dits « intelligents ».

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est un outil analytique essentiel pour le chimiste au quotidien. Elle trouve aussi de nombreuses applications en biologie et médecine, depuis la conception de médicaments avec la caractérisation structurale des protéines, jusqu'à l'analyse clinique du métabolome, et bien sûr l'imagerie par résonance magnétique (IRM). La RMN a deux atouts : elle est non invasive et fournit de l'information au niveau atomique. Ces caractéristiques permettent désormais aux chercheurs d'observer des processus chimiques dans des systèmes vivants.

L'observation spécifique d'une protéine en cellule par RMN repose sur l'utilisation d'un filtre isotopique : le milieu cellulaire ne contient que de faibles quantités des isotopes stables  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  ou  $^{19}\text{F}$ , une molécule enrichie en  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  ou  $^{19}\text{F}$  devient donc sélectivement détectable au sein de cellules vivantes par RMN (figure 1). Chaque isotope « résonne » dans une gamme de fréquences précises : on peut donc sélectionner un isotope comme on choisit une fréquence radio ou une couleur au microscope. Toutes les questions relatives aux protéines peuvent être explorées par RMN en cellule : les conformations actives ou inactives, la dynamique structurale, les interactions avec des partenaires ou des inhibiteurs, les modifications chimiques (dites post-traductionnelles), etc. Cette approche a permis des avancées fondamentales ces dernières années : la démonstration de l'existence en cellule de protéines dans un état non replié [1], le suivi d'états d'oxydo-réduction de protéines [2] ou de leur interaction avec des inhibiteurs en temps réel [3] (figure 2A). Ces informations RMN à l'échelle atomique sont complémentaires de celles

fournies par la microscopie électronique, la microscopie de fluorescence ou la RPE (résonance paramagnétique électronique), qui ont des capacités de résolution différentes. Les chercheurs perfectionnent en ce moment des bioréacteurs et des techniques spectroscopiques pour l'observation RMN en cellules ou en organoïdes.

Le principe du filtre isotopique est aussi appliqué à l'observation d'activités enzymatiques cellulaires sur des substrats : on peut les quantifier par la disparition et l'apparition de signaux RMN de substrats ou de produits. Cette approche a permis récemment de cribler des candidats inhibiteurs sur des cellules cancéreuses [4] ou des bactéries polyrésistantes aux antibiotiques [5] (figure 2B).

D'autres approches sont développées pour l'imagerie des activités enzymatiques. L'IRM est le plus souvent basée sur la RMN du proton de l'eau, très abondant dans les tissus biologiques. Le contraste est fondé sur les variations de temps de relaxation de ces protons dans les différents tissus. Il peut être modulé par des « agents de contraste » qui accélèrent cette relaxation. Malgré ses atouts, l'IRM souffre d'un manque de sensibilité et de spécificité. Il est notamment difficile de détecter une activité enzymatique dans un tissu : les substrats enzymatiques ont des concentrations et donc des intensités RMN très faibles par rapport à l'eau (quelques mmol/L au mieux, contre 55 mol/L pour l'eau). Pour lever ce verrou, une méthode IRM par effet Overhauser (OMRI) a été développée, fruit d'une collaboration de quinze ans entre l'Institut de Chimie Radicalaire de Marseille (ICR) et le Centre de

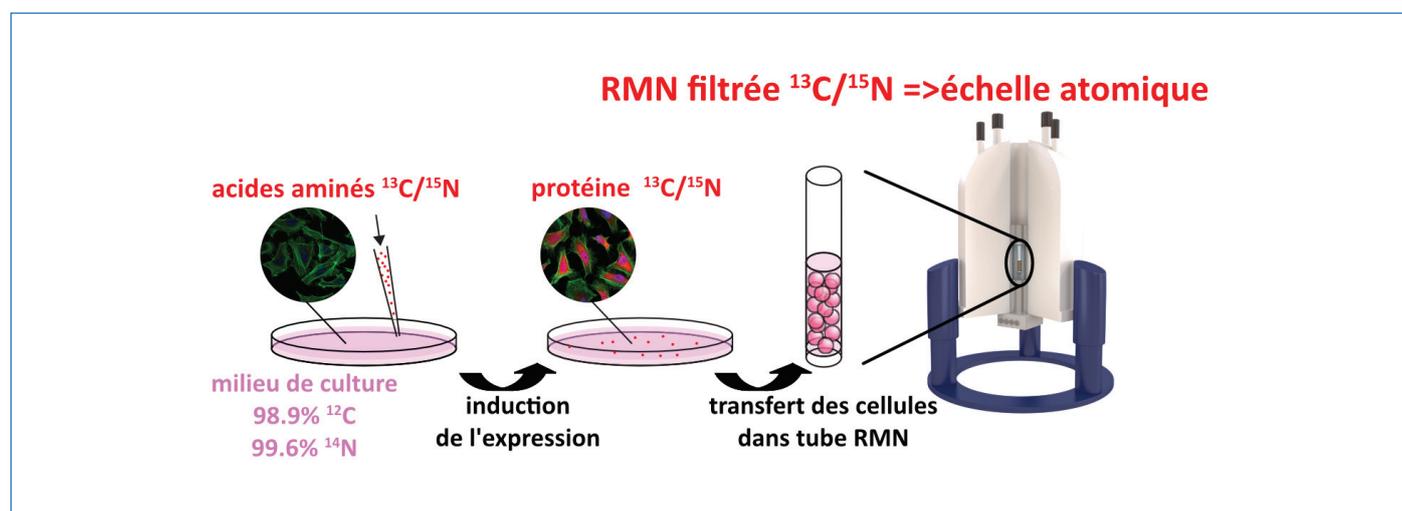


Figure 1 - Représentation schématique de la production d'échantillons pour la RMN « in-cell » avec des cellules de mammifères exprimant la protéine d'intérêt de manière inducible. L'incorporation d'isotopes  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  « visibles » pour la RMN permet leur détection sélective dans le milieu cellulaire contenant majoritairement des isotopes  $^{12}\text{C}/^{14}\text{N}$  « invisibles ». La spectroscopie RMN délivre ensuite une information potentiellement très riche à l'échelle atomique.

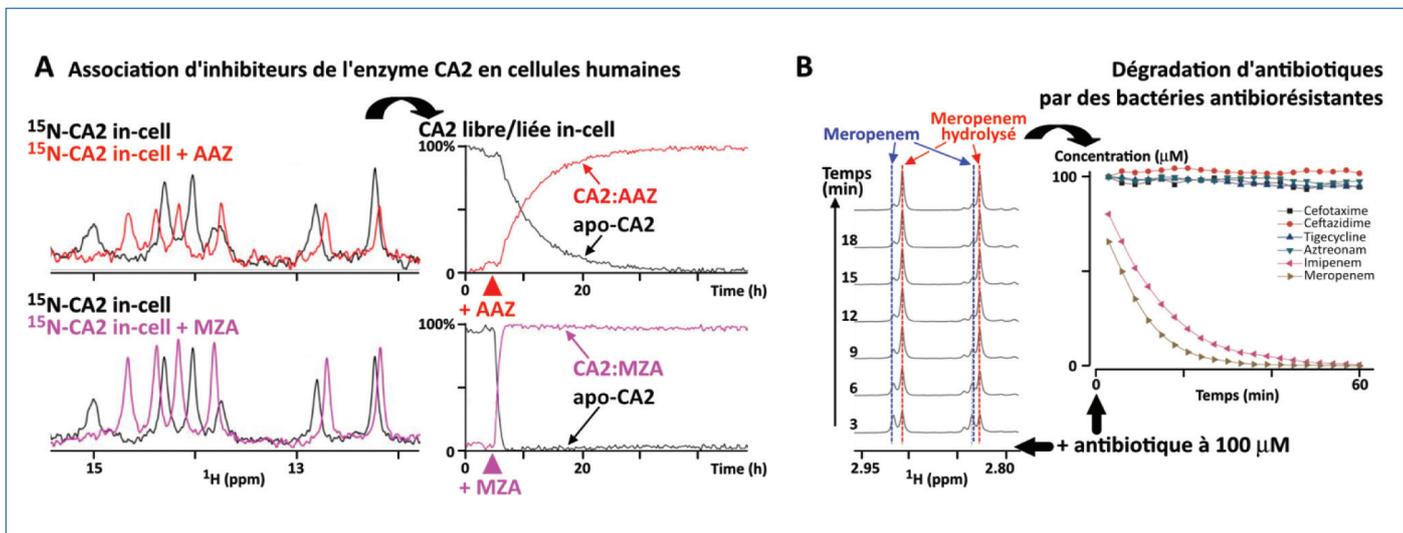


Figure 2 - Suivi en temps réel par RMN d'échantillons cellulaires : une série de spectres RMN successifs est enregistrée, puis les intensités des signaux mesurées dans chaque spectre. L'évolution de ces intensités rapporte les quantités : A) de l'anhydrase carbonique 2 (CA2) libre/liée (l'inhibiteur AAZ traverse la membrane cellulaire plus lentement que MZA ; adapté de Luchinat *et al.*, *Anal. Chem.*, 2020) ; B) d'antibiotiques intacts/hydrolysés par des bactéries exprimant l'enzyme de résistance New Delhi métallob- $\beta$ -lactamase 1 (NDM-1) ; ce schéma expérimental a permis à ces auteurs d'effectuer un criblé d'inhibiteurs de NDM-1 en bactéries (adapté de [5]).

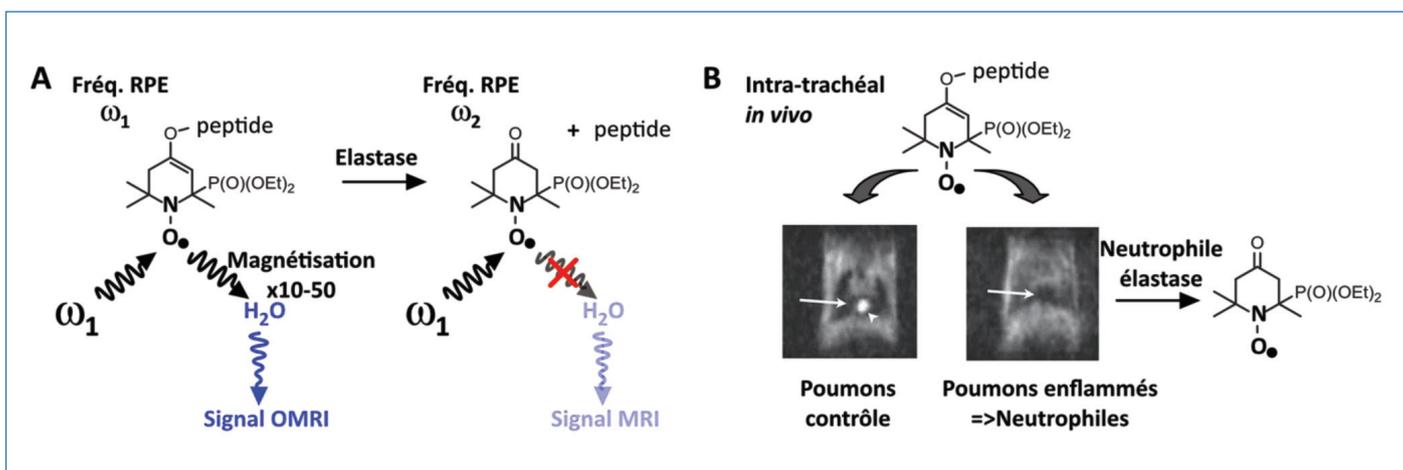


Figure 3 - Principe de fonctionnement des agents de contraste « intelligents » OMRI : A) l'irradiation EPR à la fréquence de résonance du substrat  $\omega_1$  permet de polariser la magnétisation des protons de l'eau et de générer un signal OMRI, tandis que le produit issu de l'action de l'élastase ne résonnant pas à  $\omega_1$  n'a pas cette action polarisante ; B) l'instillation intra-trachéale du substrat de l'élastase génère un signal OMRI dans les poumons sains de souris, tandis que des poumons enflammés dégradent ce substrat immédiatement [9].

Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques de Bordeaux (CRMSB). Il s'agit de détecter une activité enzymatique sur un substrat portant un radical électronique, engendrant un changement de sa fréquence RPE. La saturation RPE de l'électron est transférée et observée par RMN du proton de l'eau. Un rehaussement du signal a été obtenu, d'un facteur 50 *in vitro*, en irradiant un nitroxyde à 5,4 GHz et en détectant le proton à 8 MHz sur un imageur 0,2 T du CRMSB.

Quelle application trouver à ce gain de sensibilité prometteur ? L'ICR a conçu des agents de contraste « intelligents », des nitroxides phosphorés qui changent de conformation après leur coupure par des enzymes protéases, impliquées notamment dans la progression de cancers (figure 3A). Les changements associés se traduisent par un décalage de fréquence de résonance de l'électron [6] ou un meilleur transfert de saturation de l'électron vers l'eau [7]. La méthode a été validée *in vitro* puis *in vivo* (souris) pour détecter l'activité de l'élastase pancréatique intestinale [7] ou l'inflammation

pulmonaire [8] (figure 3B). Pour appliquer cette méthode sur le gros animal, les équipes du CRMSB et de l'ICR ont obtenu un financement européen FETOPEN (n° 863099), rassemblant sept partenaires dont deux industriels.

En caractérisant des tissus intacts et leur fonctionnement, la RMN in-cell complète les approches réductionnistes classiques (séquençage génomique, de biologie cellulaire ou de biochimie *in vitro*...). Nous pouvons finalement évoquer l'utilisation du  $^{13}\text{C}$ -pyruvate hyperpolarisé, dont la conversion accélérée en  $^{13}\text{C}$ -lactate est symptomatique d'un métabolisme cancéreux : l'IRM du  $^{13}\text{C}$ -hyperpolarisé commence à être utilisée pour le diagnostic en oncologie [9] (figure 4). Les informations au niveau atomique par RMN sont donc essentielles pour la chémobiologie fondamentale et clinique. Ainsi, soixante-quinze ans après sa découverte expérimentale, la RMN appuie la compréhension du vivant, le diagnostic de pathologies et la conception de stratégies thérapeutiques. N'hésitons pas à continuer !

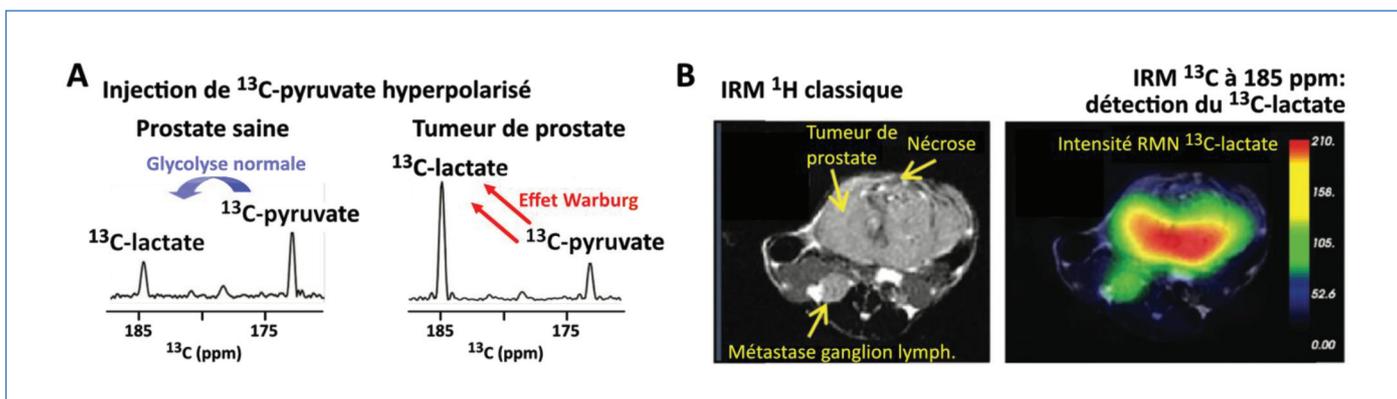


Figure 4 - A) Le  $^{13}\text{C}$ -pyruvate hyperpolarisé peut être injecté au sein de tissus, et sa vitesse de conversion en  $^{13}\text{C}$ -lactate est alors observable *in vivo* ; B) le  $^{13}\text{C}$ -lactate est observable en imagerie par la détection de signaux  $^{13}\text{C}$  à 185 ppm. Adapté de [9].

[1] F.-X. Theillet *et al.*, Structural disorder of monomeric  $\alpha$ -synuclein persists in mammalian cells, *Nature*, **2016**, *530*, p. 45-50.

[2] A. Mochizuki *et al.*, Balanced regulation of redox status of intracellular thioredoxin revealed by in-cell NMR, *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, p. 3784-790.

[3] E. Luchinat *et al.*, Drug screening in human cells by NMR spectroscopy allows the early assessment of drug potency, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*, p. 6535-539.

[4] C. Dalvit, M. Veronesi, A. Vulpetti, Fluorine NMR functional screening: from purified enzymes to human intact living cells, *J. Biomol. NMR*, **2020**, *74*, p. 613-631.

[5] J. Ma, S. McLeod, K. MacCormack, S. Sriram, N. Gao, A.L. Breeze, J. Hu, Real-time monitoring of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase activity in living bacterial cells by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *53*, p. 2130-133.

[6] G. Audran, L. Bosco, P. Brémond, J.-M. Franconi, N. Koonjoo, S.R.A. Marque *et al.*, Enzymatically shifting nitroxides for EPR spectroscopy and Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *127*, p. 13577-582.

[7] N. Koonjoo, E. Parzy, P. Massot, M. Lepetit-Coiffé, S.R.A. Marque, J.-M. Franconi *et al.*, In vivo Overhauser-enhanced MRI of proteolytic activity, *Contrast Media Mol Imaging*, **2014**, *9*, p. 363-371.

[8] A. Rivot, N. Jugniot, S. Jacoutot, N. Vanthuyne, P. Massot, P. Mellet *et al.*, Magnetic resonance imaging of protease-mediated lung tissue inflammation and injury, *ACS Omega*, **2021**, *6*, p. 15012-016.

[9] Z.J. Wang *et al.*, Hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  MRI: state of the art and future directions, *Radiology*, **2019**, *291*, p. 273-284.

**François-Xavier THEILLET,**

Chargé de recherches CNRS, Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif-sur-Yvette.

**Jean-Michel FRANCONI,**

Professeur d'université, Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR 5536, CNRS, Université de Bordeaux.

\* francois-xavier.theillet@cnsr.fr ;

jean-michel.franconi@rmsb.u-bordeaux.fr

**45**  
**Sc**  
**21**

**Culture**  
**iencesChimie**

**ENS**

MINISTÈRE  
DE L'ÉDUCATION  
NATIONALE, DE  
L'ENSEIGNEMENT  
SUPÉRIEUR ET DE  
LA RECHERCHE

Mis à disposition  
**CAPES et**  
**AGRÉGATION**  
aux épreuves orales

Site de ressources en **Chimie** pour les enseignants

Thèmes en lien avec les  
**PROGRAMMES**  
**D'ENSEIGNEMENT**

Contenu validé par des  
**CHERCHEURS**

**Articles, Vidéos, Diaporamas**

**AGENDA, ACTUALITÉS**  
événements, conférences, parutions  
scientifiques...

**http://culturesciences.chimie.ens.fr**