



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

François-Xavier Theillet, Jean-Michel Franconi

► To cite this version:

François-Xavier Theillet, Jean-Michel Franconi. La RMN, un couteau suisse pour disséquer la chimie cellulaire à toutes les échelles.. L'Actualité Chimique, 2021, 468, pp.33. hal-03807029

HAL Id: hal-03807029

<https://hal.science/hal-03807029>

Submitted on 8 Oct 2022

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.

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

Tracking in-cell chemistry at all scales by NMR

François-Xavier, Theillet ^a, CR CNRS, francois-xavier.theillet@cnrs.fr

Jean-Michel, Franconi ^b, Professeur d'Université, jean-michel.franconi@rmsb.u-bordeaux.fr

^a Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France

^b Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR5536, CNRS, Université de Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France

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 elle fournit de l'information au niveau atomique. Ces caractéristiques permettent désormais aux chercheurs d'observer des processus chemo-biologiques dans des systèmes vivants « intacts ». Nous détaillons ici deux développements récents sur la physico-chimie du vivant: la structure des protéines en cellule et la détection d'activité enzymatique avec l'IRM d'agents de contrastes dits « intelligents ».

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}C , ^{15}N ou ^{19}F ; une molécule enrichie en ^{13}C , ^{15}N ou ^{19}F devient sélectivement détectable au sein de cellules vivantes par RMN (Figure 1). Chaque isotope « résonne » dans une gamme de fréquence précise : 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)... 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, 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.

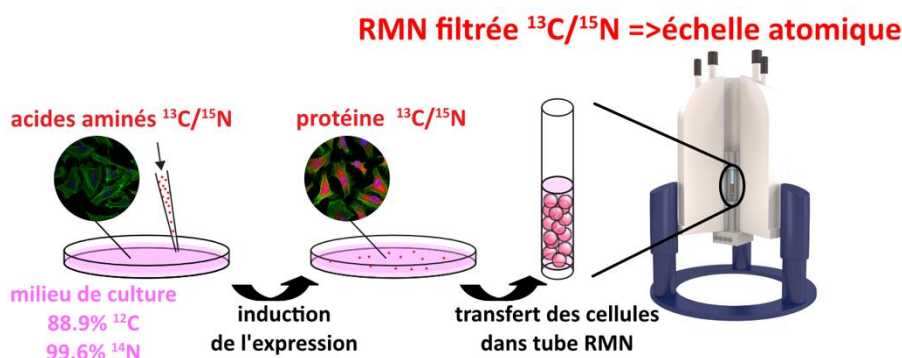


Figure 1. Représentation schématique de la production d'échantillons pour la RMN in-cell avec des cellules mammifères exprimant la protéine d'intérêt de manière inducible. L'incorporation d'isotopes $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ « visibles » pour la RMN permet leur détection sélective dans le milieu 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.

Le principe du filtre isotopique est aussi appliqué à l'observation orientée-substrat d'activités enzymatiques cellulaires : 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 poly-résistantes aux antibiotiques [5] (Figure 2B).

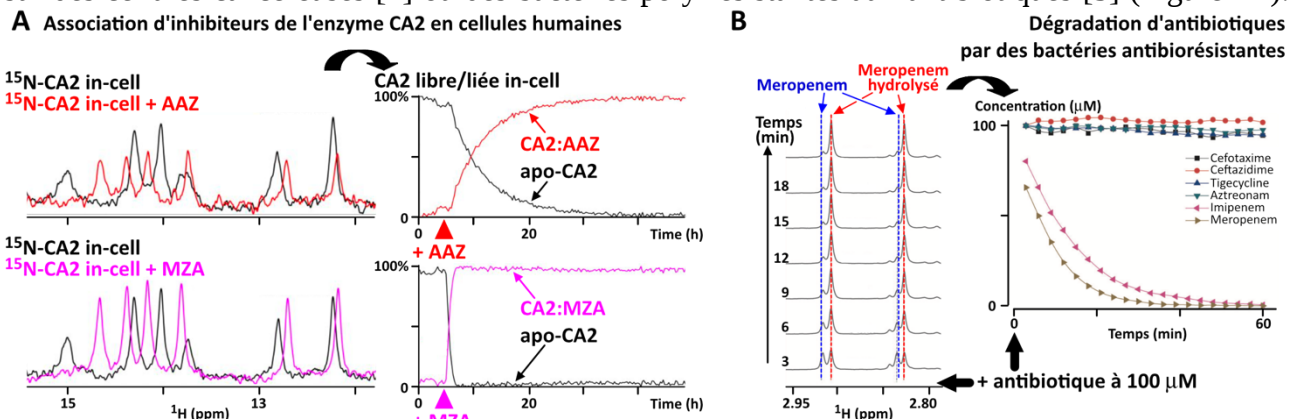


Figure 2 : Suivi « en temps-réel » par RMN d'échantillons cellulaires : une série de spectres RMN successifs est enregistrée, puis les intensités des signaux mesurées dans chaque spectre. L'évolution de ces intensités rapportent les quantités : **A)** de l'anhydrase carbonique 2 (CA2) libre/liée

(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 metallo- β -lactamase 1 (NDM-1) ; ce schéma expérimental a permis à ces auteurs d'effectuer un crible d'inhibiteurs de NDM-1 en bactéries. Adaptation de [5].

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 15 ans entre l'Institut de Chimie Radicalaire de Marseille (ICR) et le Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques de Bordeaux (CRMSB). Il s'agit de détecter une activité enzymatique par la modification d'un substrat portant un radical électronique, engendrant un changement de sa fréquence RPE (Résonance Paramagnétique Electronique). 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 7 partenaires dont deux industriels.

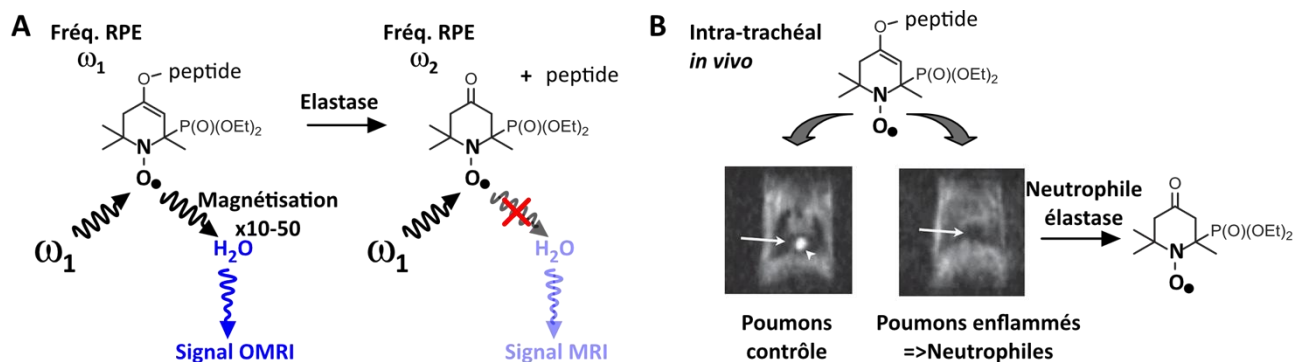


Figure 3: Principe de fonctionnement des agents de contraste « intelligents » OMRI : **A)** l'irradiation EPR à la fréquence de résonance du substrat ω_1 permet de polariser la magnétisation des protons de l'eau et de générer un signal OMRI, tandis que le produit issu de l'action de l'élastase ne résonnant pas à ω_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 dégrade ce substrat immédiatement [9].

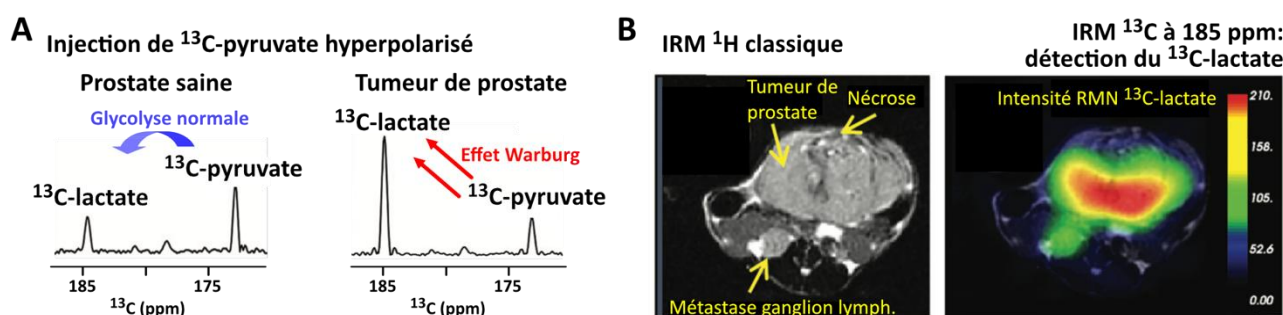


Figure 4 : **A)** Le ¹³C-pyruvate hyperpolarisé peut être injecté au sein de tissus, et sa vitesse de conversion en ¹³C-lactate est alors observable *in vivo* ; **B)** Le ¹³C-lactate est observable en imagerie par la détection de signaux ¹³C à 185 ppm. Adapté de [9].

En caractérisant des tissus intacts et leurs fonctionnements, 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 ¹³C-pyruvate hyperpolarisé, dont la conversion accélérée en ¹³C-lactate est symptomatique d'un métabolisme cancéreux : l'IRM du ¹³C-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 chemobiologie fondamentale et clinique. Ainsi, 75 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 !

Références :

- (1) F.-X. Theillet, *et al.*, Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells, *Nature*. **2016**, 530, 45-50, <https://doi:10.1038/nature16531>.
- (2) A. Mochizuki, *et al.*, Balanced Regulation of Redox Status of Intracellular Thioredoxin Revealed by in-Cell NMR, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 3784-3790, <https://doi:10.1021/jacs.8b00426>.
- (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, 6535-6539, <https://doi:10.1002/anie.201913436>.
- (4) C. Dalvit, M. Veronesi, A. Vulpetti, Fluorine NMR functional screening: from purified enzymes to human intact living cells, *J. Biomol. NMR.* **2020**, 59, 5158-19, <https://doi:10.1007/s10858-020-00311-3>.
- (5) J. Ma, S. McLeod, K. MacCormack, S. Sriram, N. Gao, A.L. Breeze, J. Hu, Real-Time Monitoring of New Delhi Metallo- β -Lactamase Activity in Living Bacterial Cells by ^1H NMR Spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 53, 2130-2133, doi:10.1002/anie.201308636.
- (6) G. Audran, L. Bosco, P. Br mond, 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.* 127 (2015) 13577–13582. doi:10.1002/ange.201506267.
- (7) N. Koonjoo, E. Parzy, P. Massot, M. Lepetit-Coiff , S.R.A. Marque, J.-M. Franconi, *et al.*, In vivo Overhauser-enhanced MRI of proteolytic activity, *Contrast Media Mol Imaging*. 9 (2014) 363–371. doi:10.1002/cmmi.1586.
- (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*. 6 (2021) 15012-15016. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01150>
- (9) Z.J. Wang, *et al.*, Hyperpolarized ^{13}C MRI: State of the Art and Future Directions, *Radiology*. **2019**, 291, 273–284, <https://doi:10.1148/radiol.2019182391>.