

# Étude cinétique et fluxomique du métabolisme cellulaire de la glutamine par DNP par dissolution : application au traitement contre le lymphome

## I. Contexte du projet de recherche doctorale et objectifs

Le projet de recherche proposé vise à étudier et modéliser la cinétique de plusieurs étapes du métabolisme de la glutamine *in vitro*, puis sur des cellules en culture, dans la perspective d'une recherche de traitements contre le lymphome diffus à grandes cellules B (« Diffuse Large B Cell Lymphoma », DLBCL). Il a en effet été montré que le métabolisme de la glutamine pouvait être caractéristique du dérèglement énergétique dont les cellules cancéreuses font preuve pour répondre à leurs importants besoins énergétiques, **au même titre que le dérèglement de la phosphorylation oxydative mitochondriale ou que la surconsommation de glucose**. La glutamine est ainsi une cible de choix potentielle pour de nouveaux traitements anti-cancéreux dits anti-métaboliques, ayant pour but de priver les cellules tumorales de leurs apports énergétiques [1]–[4]. C'est pourquoi il est particulièrement important de caractériser au mieux ces transformations métaboliques, notamment sur le plan cinétique.

Variété particulièrement agressive de lymphome non-hodgkinien, le DLBCL, pour lequel près de 40% des patients sont résistants aux traitements, est à l'origine de nombreuses rechutes et d'échecs thérapeutiques, donc de décès. Afin de lutter contre ce type de lymphome, et pour contourner les limites des thérapeutiques conventionnelles (type poison du fuseau, agents alkylants, ...), de nouvelles approches reposant sur des stratégies anti-métaboliques sont actuellement à l'étude. Dans ce contexte, une attention particulière est portée à l'étude de l'enzyme L-asparaginase (ou Kidrolase). Cette enzyme, connue initialement pour son rôle dans la conversion de l'asparagine en aspartate, est également active sur la transformation de la glutamine en glutamate. Récemment, il a été démontré que son association avec d'autres traitements anti-métaboliques comme par exemple la metformine (un inhibiteur de la respiration mitochondriale), pouvait avoir un effet synergique et provoquer une apoptose massive des cellules du lymphome DLBCL. De plus, des analyses par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) sur les métabolomes intra et extracellulaires de cellules DLBCL ont permis d'éclairer la façon dont ces drogues anti-métaboliques affectaient les métabolomes du DLBCL (**travaux en cours de publication**). En particulier, il est possible de suivre les circuits empruntés par les endo- et exo-métabolomes spécifiques à chaque traitement.

La méthode proposée pour suivre ces cinétiques métaboliques est la spectroscopie RMN. **Avec son application à l'imagerie médicale, l'IRM, ce sont des méthodes polyvalentes et efficaces**, et très largement utilisées dans de nombreux domaines, en recherche comme dans l'industrie, notamment dans le domaine de la santé. Elles permettent d'obtenir des informations quantitatives sur la structure et la dynamique des molécules, et l'IRM est aujourd'hui une technique majeure d'imagerie médicale. **Cependant, une des limitations majeures de la RMN est son manque intrinsèque de sensibilité**, qui a pour conséquences des durées d'expérience importantes, parfois prohibitives, pour obtenir un signal exploitable. Ceci s'avère extrêmement préjudiciable pour l'étude de processus rapides (< 60 s) en temps réel, souvent difficile voire impossible à réaliser. **Cette faible sensibilité provient d'une faible polarisation des spins nucléaires** de l'échantillon à l'équilibre thermique dans le champ magnétique appliqué. Cette polarisation (la différence relative de populations entre deux niveaux d'énergie de spin) est de l'ordre de  $10^{-4}$  (sans unité) même en utilisant les aimants les plus puissants à ce jour (> 23 T), qui ont un coût de plusieurs millions d'euros.

**Pour remédier à ce déficit de sensibilité, plusieurs méthodes dites d'hyperpolarisation ont été développées**, avec pour but d'augmenter la polarisation des spins à laquelle le signal de RMN ou d'IRM mesuré est proportionnel. **Parmi elles, la polarisation dynamique nucléaire** (appelée DNP, son acronyme anglais) et en particulier son application à la RMN en solutions, la DNP par dissolution (ou D-DNP) est au cœur de ce projet de doctorat. Depuis son invention en 2003, elle a suscité un intérêt important, de par sa capacité à obtenir des signaux RMN ou IRM jusqu'à **quatre ordres de grandeur** plus intenses [5]. De nombreux développements instrumentaux sont intervenus, permettant une optimisation de la méthode, notamment à des fins d'imagerie médicale mais également dans des applications variées liées en majorité au domaine de la santé [6]–[8]. Son principe est le suivant :

- 1) Polarisation d'un échantillon en phase solide à très basse température (environ 1.2 K) dans un instrument appelé **polariseur** ;
- 2) Dissolution de l'échantillon « hyperpolarisé » par un solvant chauffé autour de 180°C ;
- 3) Transfert par un système fluidique sous pression d'hélium gazeux vers un spectromètre RMN ;

- 4) Mesures à température ambiante, utilisant le signal amplifié pendant quelques dizaines de secondes.

Ce projet de recherche doctorale se situe dans un domaine d'application extrêmement stimulant de la D-DNP, bien qu'encore peu développé, à savoir l'étude du métabolisme cellulaire *in vivo* en temps réel. En effet, très **peu de laboratoires dans le monde ont à ce jour publié des travaux dans ce domaine** [9]–[11]. C'est le cas du pôle « Structure et dynamique des biomolécules » du Laboratoire des Biomolécules (LBM, Sorbonne Université et École Normale Supérieure), porteur de ce projet et dirigé par le Dr. Daniel Abergel, qui possède une solide expérience à l'interface entre l'instrumentation complexe utilisée pour la D-DNP et des applications à des problématiques biologiques comme l'illustrent ses travaux sur la cinétique enzymatique et la voie métabolique des pentoses phosphates [12], [13]. Le savoir-faire du LBM en termes de préparation d'échantillons biologiques comme les cultures cellulaires et leur utilisation dans les conditions spécifiques aux expériences de D-DNP assure une base méthodologique et instrumentale de choix pour ce projet.

De son côté, l'équipe de Bio-Spectroscopies du laboratoire de Chimie et Biologie Toxicologiques et Pharmacologiques (Université de Paris) dirigée par le Pr. Nicolas Giraud est en prise directe avec des questions liées à la biologie et la santé, et très largement impliquée dans la **métabolomique**, grâce au développement de méthodes dédiées permettant en particulier l'acquisition de spectres à très haute résolution et l'utilisation de la D-DNP. En particulier, les travaux en métabolomique du Dr. Gildas Bertho en collaboration avec l'équipe du Dr. Véronique Baud (Université de Paris) sur le DLBCL ont permis de démontrer l'intérêt de l'utilisation de techniques avancées de RMN pour étudier la réponse des cellules de lymphomes aux traitements anti-métaboliques (**travaux en cours de publication**). Forts de trois polariseurs pour la DNP par dissolution, les deux laboratoires impliqués présentent des compétences complémentaires ainsi qu'une **plateforme instrumentale inédite** dans le domaine pour traiter le thème du **métabolisme cellulaire dans des conditions pathologiques** par RMN hyperpolarisée.

## II. Interdisciplinarité du projet et méthode de mise en œuvre

**Le projet de recherche présenté se situe à l'interface entre la biologie, la pharmacologie et les approches de pointe en spectroscopie RMN.** Pour le mener à bien il nécessite l'association de compétences très diverses. D'une part, la maîtrise des techniques de D-DNP. D'autre part, le développement et la maîtrise de techniques de métabolomique.

Le sujet nécessitera donc de développer chez le ou la doctorant(e) des connaissances et des compétences aux croisements de la biologie, de la chimie et de la physique, en particulier sur les thèmes suivants :

- Métabolisme de la glutamine et marqueurs du cancer dans le métabolisme cellulaire ;
- Action de la L-asparaginase, préparation d'échantillons *in vitro* puis cultures cellulaires pour les échantillons *in vivo* ;
- Techniques et instrumentations de base de la RMN et techniques, instrumentation et ingénierie spécifique à la D-DNP (par exemple : cryogénie, vide, sources micro-ondes, ...) ;
- Physique de la DNP, mécanismes de polarisation et formulation d'échantillons pour la DNP par dissolution adaptés aux substrats biologiques considérés.

Le ou la doctorant(e) participera à **part égale de son temps** aux activités de recherche au sein des deux laboratoires, qui possèdent une instrumentation complémentaire.

Une grande polyvalence lui sera demandée, **le sujet traitant principalement de problématiques biologiques mais nécessitant des compétences en physique et en ingénierie** non négligeables : les polariseurs de D-DNP sont des prototypes, et une partie du travail de doctorat consistera en leur amélioration et leur adaptation spécifique aux échantillons biologiques, et notamment les cellules vivantes. En effet, des systèmes commerciaux aux prototypes individuels tels que ceux présents dans les laboratoires de l'ENS et de l'Université de Paris, peu, voire aucune attention n'a été apportée à la nature de l'échantillon utilisé. Il sera par conséquent crucial de développer les systèmes afin d'assurer des transferts et des injections rapides et reproductibles, des mélanges optimaux pour les cocktails enzymatiques utilisés *in vitro*, et de pouvoir également les utiliser sur des cellules vivantes sans les endommager.

Afin de procéder aux expériences de D-DNP sur les échantillons biologiques, le ou la doctorant(e) devra également optimiser l'étape de la polarisation du substrat injecté, en l'occurrence la glutamine. Il faudra pour cela optimiser la formulation de l'échantillon (contenant radicaux libres et agents tels que le glycérol ou le DMSO, qui permettent d'éviter la cristallisation de l'échantillon et la partition de phase entre radicaux et

substrat), et les conditions de polarisation (séquences d'impulsion RMN, irradiation micro-onde, ...). Enfin, l'observation en temps réel par RMN du métabolisme cellulaire nécessitera le développement de séquences d'impulsions dédiées pour mettre en valeur les produits obtenus, dont le signal est souvent inférieur à celui du substrat injecté de plusieurs ordres de grandeur.

Les expériences sur les enzymes et échantillons biologiques suivront plusieurs étapes de mise en œuvre afin que le/la doctorant(e) se familiarise avec les systèmes modélisés selon un degré de complexité croissant :

- 1) Dans un premier temps, mise en œuvre d'expériences de suivi sur des durées plus longues que des expériences de D-DNP à l'aide de RMN classique afin de tester l'efficacité des enzymes considérées et obtenir de premières estimations des durées réactionnelles ;
- 2) Observations à l'aide de la D-DNP de réactions enzymatiques *in vitro* afin d'extraire les paramètres cinétiques des étapes des voies métaboliques concernées. En particulier, il sera intéressant de caractériser dans un premier temps la conversion de la glutamine en glutamate, qui est la première étape suivant l'internalisation de la glutamine par la cellule ;
- 3) a) Observation globale, sur des cellules vivantes et en temps réel, du métabolisme de la glutamine et analyse des paramètres cinétiques ;  
b) À défaut et si l'internalisation de la glutamine limitait la sensibilité, expérience sur des lysats cellulaires pour détecter les flux métaboliques dans des conditions simplifiées ;
- 4) Observation de l'effet de divers traitements anti-métaboliques comme la kidrolase sur la cinétique réactionnelle.

Les bénéfices de ce projet concerneraient d'abord la métabolomique, en travaillant sur des séries d'échantillons plus importantes selon la méthode établie, mais en variant les possibles traitements. Concernant toujours le domaine de la santé, les examens actuels pour le diagnostic et le suivi de traitement des lymphomes se basent essentiellement sur l'imagerie par TEP du glucose-<sup>18</sup>F. Un objectif à moyen terme serait de tester par IRM préclinique un suivi en temps réel du métabolisme de la glutamine, qui viendrait idéalement compléter l'utilisation du glucose et du pyruvate, ce dernier étant déjà à l'essai en phase préclinique, afin d'obtenir une caractérisation améliorée de la consommation énergétiques des cellules.

### III. Références

- [1] D. Hanahan and R. A. Weinberg, *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [2] N. Hay, *Nat. Rev. Cancer*, vol. 16, no. 10, pp. 635–649, Oct. 2016, doi: 10.1038/nrc.2016.77.
- [3] P. S. Ward and C. B. Thompson, *Cancer Cell*, vol. 21, no. 3, pp. 297–308, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.014.
- [4] B. J. Altman, Z. E. Stine, and C. V. Dang, *Nat. Rev. Cancer*, vol. 16, no. 10, pp. 619–634, Oct. 2016, doi: 10.1038/nrc.2016.71.
- [5] J. H. Ardenkjaer-Larsen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 18, pp. 10158–10163, Sep. 2003, doi: 10.1073/pnas.1733835100.
- [6] S. J. Nelson *et al.*, *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, no. 198, p. 198ra108, Aug. 2013, doi: 10.1126/scitranslmed.3006070.
- [7] J. H. Ardenkjaer-Larsen, *J. Magn. Reson.*, vol. 264, pp. 3–12, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.jmr.2016.01.015.
- [8] A. Bornet and S. Jannin, *J. Magn. Reson.*, vol. 264, pp. 13–21, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.jmr.2015.12.007.
- [9] T. Harris, H. Degani, and L. Frydman, *NMR Biomed.*, vol. 26, no. 12, pp. 1831–1843, 2013, doi: 10.1002/nbm.3024.
- [10] M. Liu and C. Hilty, *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 2, pp. 1217–1222, Jan. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.7b03901.
- [11] G. Zhang, *et al.*, *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 18, pp. 11131–11137, Sep. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b03096.
- [12] E. Miclet, *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 5, no. 19, pp. 3290–3295, Oct. 2014, doi: 10.1021/jz501411d.
- [13] A. Sadet *et al.*, *Chem. – Eur. J.*, vol. 24, no. 21, pp. 5456–5461, 2018, doi: 10.1002/chem.201705520.