

Étude des électrolytes intracellulaires par résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire permet aujourd'hui d'étudier in situ des électrolytes et des métabolites des milieux intracellulaires et extracellulaires.

**Yvan Boulanger
Patrick Vinay**

*Chercheurs à la faculté de médecine
de l'université de Montréal*

La quantification et l'étude des mouvements des électrolytes (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , Cl^- , PO_4^{2-} , etc) dans les milieux biologiques s'effectuent habituellement par des techniques qui portent atteinte à l'intégrité des tissus utilisés. Dans le cas de la photométrie par absorption atomique, par exemple, un échantillon liquide est ionisé par une flamme à travers laquelle passe un faisceau permettant la détection d'un ion spécifique. La mesure s'effectue évidemment de façon destructive et nécessite une homogénéisation préalable de l'échantillon, en particulier lorsqu'il s'agit de quantifier les électrolytes intracellulaires. Les microélectrodes permettent de mesurer l'activité des ions à l'intérieur des cellules mais cette technique requiert une insertion à travers la membrane, manœuvre susceptible de provoquer des flux d'ions et de changer les concentrations intracellulaires. De plus, la mesure obtenue représente une estimation de la concentration locale des ions observés qui pourrait ne pas correspondre à la valeur moyenne dans la cellule. La résonance magnétique nucléaire (RMN) représente une alternative aux techniques traditionnelles et a l'avantage de ne causer aucune perturbation physique à l'échantillon. En effet, cette méthode spectroscopique est basée sur les propriétés magnétiques des noyaux atomiques (spin). Dans des champs magnétiques intenses,

il est possible d'observer les transitions énergétiques de noyaux spécifiques possédant un spin différent de zéro, tels le ^1H , le ^{13}C , le ^{23}Na , le ^{39}K , le ^{31}P et plusieurs autres [1, 2]. En fait, presque tous les noyaux du tableau périodique possèdent au moins un isotope qui peut être observé en RMN. Bien que la RMN soit une technique relativement peu sensible, la méthode de transformation de Fourier et l'utilisation de champs magnétiques de plus en plus intenses nous permettent aujourd'hui d'étudier des quantités de plus en plus faibles d'échantillon. Une quantité de 1 μmole est habituellement requise pour la détection optimale des noyaux les plus sensibles.

Noyaux présents dans les électrolytes

Les électrolytes sont habituellement de petites molécules existant sous forme dissociée en solution et sont constitués d'un seul ou de plusieurs atomes. La RMN observera donc le noyau ou l'un des noyaux présents dans cet électrolyte. La facilité avec laquelle un noyau peut être observé dépend de sa sensibilité (pourcentage isotopique et propriétés magnétiques), de sa fréquence d'excitation et de sa nature quadripolaire ou dipolaire [2, 3]. Le noyau le plus facile à détecter est le ^1H car sa sensibilité et sa fréquence d'excitation sont les plus élevées de tous les noyaux naturels. Malheureusement, plusieurs électrolytes

ADRESSE ET TIRÉS À PART

Y. Boulanger, P. Vinay : institut de génie biomédical et département de physiologie, université de Montréal, C.P. 6128, Succ. A, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

d'intérêt biologique ne contiennent pas de protons et des phénomènes d'échange chimique avec l'eau empêchent souvent leur détection. Parmi les noyaux facilement détectables, notons le ^{23}Na puisque l'ion Na^+ est abondant dans les tissus (5-150 mM) où il joue un rôle essentiel pour l'équilibre ionique des cellules. L'ion K^+ (^{39}K), qui est lui aussi impliqué dans cet équilibre, se détecte un peu plus difficilement. L'observation du ^{31}P s'effectue facilement et permet la mesure du pH, de même que l'identification des métabolites phosphatés. Il est aussi possible de détecter l'ion NH_4^+ par RMN du ^{14}N , car cet ion est relativement abondant dans certains tissus : le rein, par exemple. La détection du Cl^- (^{35}Cl ou ^{37}Cl) s'effectue aussi assez facilement. La plupart des autres ions biologiques, tels le Ca^{2+} , le Mg^{2+} , le Zn^{2+} , etc., sont difficiles à observer en raison de leurs faibles concentrations dans les échantillons biologiques et de leurs propriétés peu favorables à la détection en RMN. Notons que dans les cas où l'abondance naturelle de l'isotope observable est faible (exemple : ^{13}C , ^{43}Ca), le marquage isotopique peut être utilisé pour augmenter le nombre de noyaux et faciliter ainsi la détection.

Signaux intra- et extracellulaires

Dans plusieurs cas, les électrolytes d'intérêt biologique existent uniquement dans le compartiment intracellulaire et il n'y a pas de problème à assigner au signal observé son milieu d'origine. C'est le cas par exemple pour la plupart des composés phosphatés qui sont associés aux processus métaboliques [4]. La figure 1 montre un spectre RMN du ^{31}P obtenu avec une suspension de tubules collecteurs de rein de veau. Les signaux d'ATP (pics 5-7), de glycérphosphorylcholine (pic 3) et des sucres phosphatés (pic 1) proviennent du milieu intracellulaire où ces électrolytes

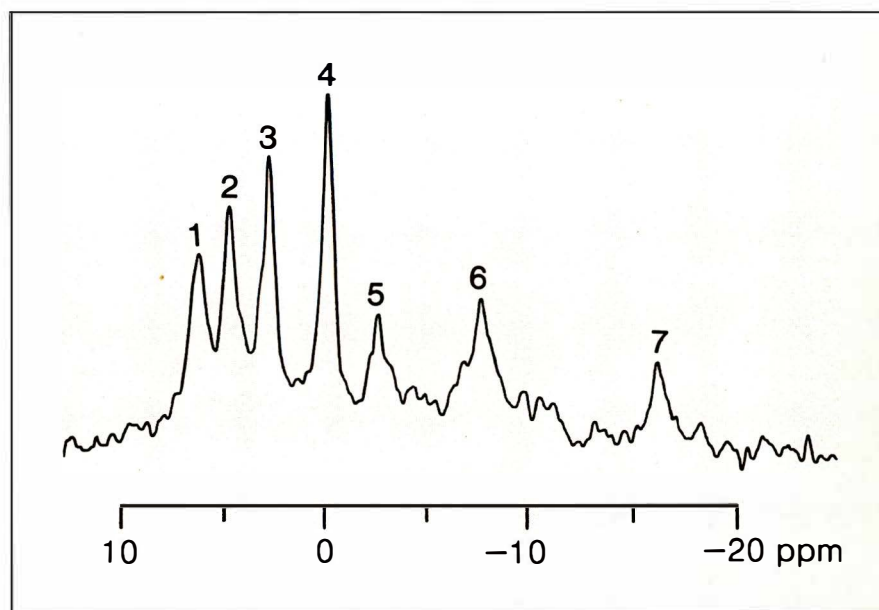


Figure 1. **Spectre RMN du ^{31}P** obtenu avec un échantillon de tubules collecteurs de rein de veau suspendus dans un tampon Hepes 150 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgSO_4 2 mM et glucose 100 mM à pH 7,4. Les pics observés correspondent à (1) sucres phosphatés, (2) phosphate inorganique, (3) glycérphosphorylcholine, (4) phosphocréatine standard, (5) γ -ATP, (6) α -ATP et (7) β -ATP.

sont localisés. Le signal de la phosphocréatine (pic 4) provient du milieu extracellulaire car cette molécule y a été ajoutée comme référence. Quant au signal du phosphate inorganique (Pi, pic 2), il provient à la fois des milieux intra- et extracellulaires et il n'est pas possible dans ce cas de distinguer la contribution respective de chacun de ces milieux.

Le déplacement chimique (position du pic) du signal du phosphate inorganique est sensible au pH. Il est donc possible de distinguer les signaux de Pi intra- et extracellulaires quand un gradient de pH suffisant existe de part et d'autre de la membrane séparant les signaux provenant de ces deux milieux. L'expérience illustrée à la figure 2 effectuée avec une suspension d'érythrocytes après addition de Pi 130 mM à pH 6,4 en donne un exemple [5]. A partir des deux signaux de Pi observés, la concentration de Pi de même que le pH dans les milieux intra- et extracellulaires peuvent être estimés en fonction du temps. Les concentrations sont mesurées à

partir des surfaces sous la courbe alors que les valeurs de pH proviennent des mesures de déplacements chimiques. La figure 2 montre également la variation des concentrations de l'ion Cl^- dans le milieu extracellulaire telles qu'elles sont détectées en RMN du ^{35}Cl . Cette mesure est possible car le signal du Cl^- intracellulaire est tellement élargi que seul le Cl^- extracellulaire peut être observé. Pour certains électrolytes, il est possible de distinguer le signal intracellulaire du signal extracellulaire en ajoutant un agent paramagnétique capable de changer l'environnement magnétique des ions présents dans le milieu extracellulaire. Par exemple, pour distinguer les signaux intra- et extracellulaires de l'ion Na^+ dans une suspension de cellules, il est nécessaire d'utiliser des agents paramagnétiques [6-8] car, en leur absence, il y a chevauchement des deux signaux en raison de l'osmolarité à peu près équivalente de chaque côté de la membrane. La figure 3 montre un spectre RMN du ^{23}Na obtenu avec des tubules

RÉFÉRENCES

1. Becker ED. *High-Resolution NMR Theory and Chemical Applications*. New York : Academic Press, 1980.
2. Laszlo P, ed. *NMR of Newly Accessible Nuclei. Chemical and Biochemical Applications*. New York : Academic Press, 1983 : vol. 1 et 2.
3. Forsén S, Lindman B. Ion binding in biological systems as studied by NMR spectroscopy. *Methods Biochem Anal* 1980 ; 27 : 289-486.
4. Gadian DG. *Nuclear Magnetic Resonance and its Applications to Living Systems*. Oxford : Clarendon Press, 1982.
5. Brauer M, Spread CY, Reithmeier RAF, Sykes BD. ^{31}P and ^{35}Cl nuclear magnetic resonance measurements of anion transport in human erythrocytes. *J Biol Chem* 1985 ; 260 : 11643-50.
6. Gupta RK, Gupta P. Direct observation of resolved resonances from intra- and extracellular sodium-23 ions in NMR studies of intact cells and tissues using dysprosium (III) tripolyphosphate as paramagnetic shift reagent. *Journal of Magnetic Resonance* 1982 ; 47 : 344-50.
7. Pike MM, Yarmush DM, Balschi JA, Lenkinski RE, Springer Jr CS. Aqueous shift reagents for high-resolution cationic nuclear magnetic resonance. 2. ^{25}Mg , ^{39}K , and ^{23}Na resonances shifted by chelidamate complexes of dysprosium (III) and thulium (III). *Inorg Chem* 1983 ; 22 : 2388-92.
8. Belton PS, Ratcliffe RG. NMR and compartmentation in biological tissues. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 1985 ; 17 : 241-79.
9. Inagaki F, Miyazawa T. NMR analyses of molecular conformations and conformational equilibria with the lanthanide probe method. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 1981 ; 14 : 67-111.
10. Pike MM, Frazer JC, Dedrick DF., et al. ^{23}Na and ^{39}K nuclear magnetic resonance studies of perfused rat hearts : Discrimination of intra- and extracellular ions using a shift reagent. *Biophys J* 1985 ; 48 : 159-73.
11. Van Belle H. Kinetics and inhibition of alkaline phosphatases from canine tissues. *Biochem Biophys Acta* 1972 ; 289 : 158-68.
12. Boulanger Y, Vinay P, Desroches M. Measurement of a wide range of intracellular sodium concentrations in erythrocytes by ^{23}Na nuclear magnetic resonance. *Biophys J* 1985 ; 47 : 553-61.
13. Ogino T, Den Hollander JA, Shulman RG. ^{39}K , ^{23}Na , and ^{31}P NMR studies of ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 ; 80 : 5185-9.
14. Boulanger Y, Vinay P, Phan Viet MT, Guardo R, Desroches M. An improved perfusion system for NMR study of living cells. *Magnetic Resonance in Medicine* 1985 ; 2 : 495-500.

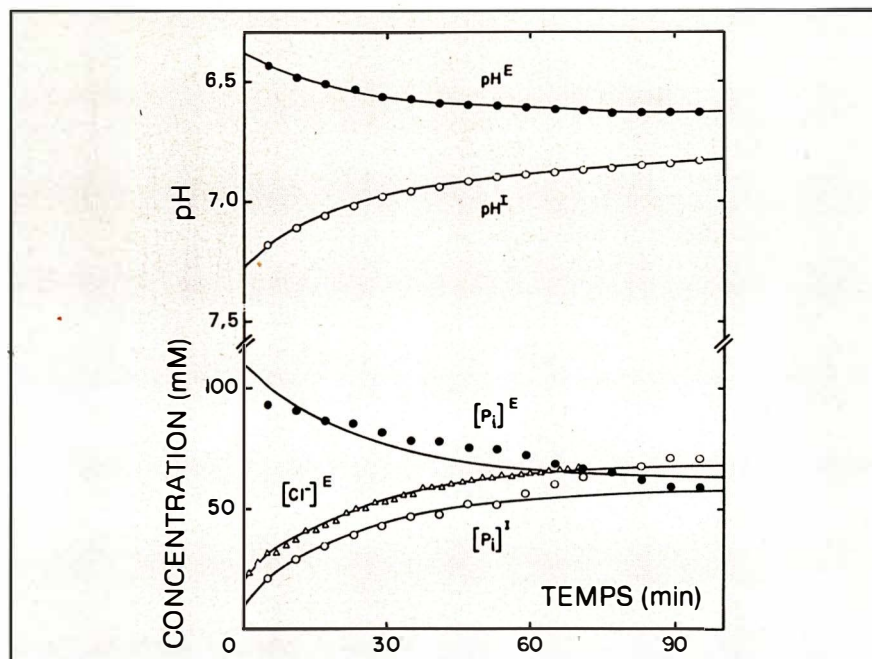


Figure 2. Variation du pH intra- (pH^{I}) et extracellulaire (pH^{E}), des concentrations de phosphate inorganique intra- ($[\text{Pi}]^{\text{I}}$) et extracellulaire ($[\text{Pi}]^{\text{E}}$) et de chlore extracellulaire ($[\text{Cl}^-]^{\text{E}}$) pour une suspension d'érythrocytes humains où un transport anionique a été provoqué par l'addition de quantités égales de Pi^{E} 130 mM et d'érythrocytes entassés. Les mesures de pH et de $[\text{Pi}]$ proviennent des spectres RMN du ^{31}P alors que les $[\text{Cl}^-]$ sont obtenues par RMN du ^{35}Cl . Les lignes pleines pour les courbes de concentrations sont calculées avec un modèle de transporteur mobile (reproduit de [5]).

corticaux de rein de chien suspendus dans un tampon physiologique (solution saline de Krebs-Henseleit) additionné de tripolyphosphate de dysprosium comme agent paramagnétique. Le pic central qui n'a subi aucun déplacement provient du sodium intracellulaire qui n'est pas affecté par la présence de l'agent paramagnétique. Le pic de droite est dû au sodium extracellulaire et il est déplacé vers la droite à cause de la présence de tripolyphosphate de dysprosium. Enfin, le pic de gauche provient d'un standard externe enclos dans un capillaire placé au milieu de l'échantillon. Ce standard contient du chlorure de sodium et du chlorure de dysprosium comme agent paramagnétique déplaçant le pic vers la gauche. Il permet de quantifier les signaux et de corriger les fluctuations internes du spectromètre RMN.

Les agents paramagnétiques peu-

vent également changer la vitesse de relaxation des noyaux observés (ce qui change la largeur de raie) [9]. On voit, dans l'exemple choisi plus haut, que les variations de déplacement chimique peuvent être positives ou négatives. Pour distinguer les milieux intra- et extracellulaires, il est nécessaire de choisir un agent qui provoque un déplacement chimique important sans affecter la relaxation du noyau. Les meilleurs résultats sont obtenus avec les complexes de dysprosium. Les agents paramagnétiques les plus utilisés sont le tripolyphosphate (PPP) et le triéthylène tétramine hexaacétate (TTHA) de dysprosium [6, 8, 10]. Le PPP de dysprosium provoque de plus grands déplacements que les autres ligands mais la stabilité limitée de ce complexe peut poser divers problèmes, notamment de toxicité. De plus, le PPP est dégradé par les phosphatases membranaires. Ce pro-

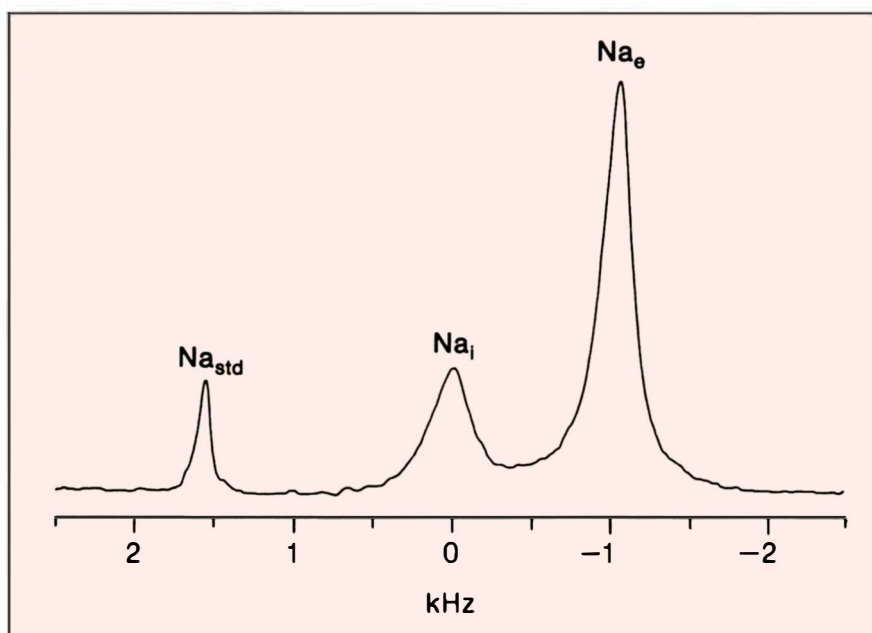


Figure 3. **Spectre RMN du ^{23}Na** obtenu pour un échantillon de tubules corticaux de rein de chien suspendus dans un périfusât contenant l'agent paramagnétique tripolyphosphate de dysprosium. Cet agent cause un déplacement du pic correspondant au sodium extracellulaire (Na_e) vers des basses fréquences (droite) alors que le pic correspondant au sodium intracellulaire (Na_i) n'est pas affecté. Le signal d'un standard physiquement séparé de chlorure de sodium (Na_{std}) est déplacé vers la gauche par le chlorure de dysprosium.

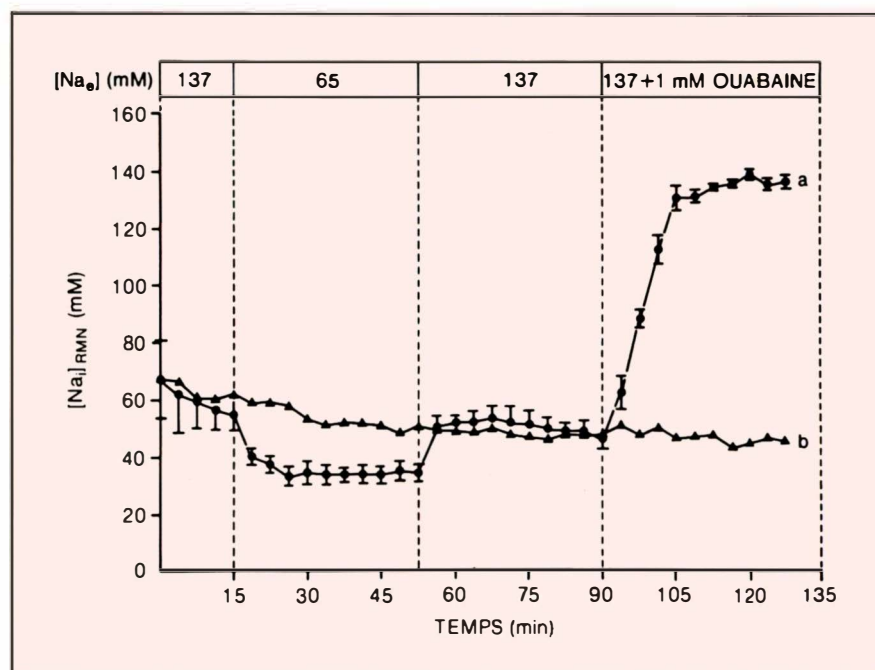


Figure 4. **Variation de la concentration de sodium intracellulaire en fonction du temps** telle que mesurée par RMN ($[\text{Na}]_{\text{RMN}}$) pour des tubules corticaux de rein de chien (a) avec changement de la concentration de sodium extracellulaire ($[\text{Na}_e]$) et addition de ouabaine 1 mM et (b) sans changement du milieu extracellulaire. La mesure RMN a été effectuée en utilisant le système de périfusion où les tubules sont insérés dans des fibres de dialyse [14].

cessus peut être minimisé par l'utilisation d'un inhibiteur de ces enzymes, le lévamisole [11]. Le TTHA de dysprosium est plus stable mais produit des déplacements moins grands. Il a notamment été utilisé pour des études sur le cœur de rat [10].

Les problèmes de visibilité

Une partie importante du signal RMN des électrolytes peut ne pas être observable à cause d'un élargissement excessif des raies résultant de phénomènes quadrupolaires, d'anisotropie du déplacement chimique, de relaxation ou de susceptibilité magnétique. C'est le cas du ^{23}Na et du ^{39}K qui sont quadrupolaires, du ^{31}P qui présente une anisotropie du déplacement chimique et de plusieurs autres noyaux. Ces effets se produisent lorsque les ions sont restreints dans leur mouvement à la suite d'interactions avec des macromolécules ou lorsqu'ils sont dans des milieux non homogènes. Bien qu'il y ait quelques désaccords à ce sujet, il semble maintenant que le ^{23}Na ne soit pas complètement visible en RMN dans tous les systèmes cellulaires étudiés. Ainsi, dans les érythrocytes, seulement 75-80 % du signal sont visibles [12] et, dans les autres organes, la visibilité se situe autour de 40 % ou moins. Ces données indiquent que l'ion sodium n'est pas en rotation libre dans le milieu intracellulaire, probablement parce qu'il est en partie lié à des structures macromoléculaires biologiques. Pour le ^{39}K qui est également quadrupolaire, une visibilité comparable à celle du ^{23}Na , soit 40 %, a été rapportée pour des cellules de levure [13] mais peu de données existent pour d'autres types de tissus. Le ^{31}P , qui est un noyau non quadrupolaire, peut donner lieu à des signaux élargis lorsque le mouvement moléculaire est suffisamment lent pour permettre d'observer les effets du phénomène d'anisotropie du déplacement chimique. C'est le cas pour des métabolites comme l'ADP qui

est immobilisé dans les structures cellulaires [4]. Cependant, quand les molécules sont en rotation libre, la totalité du signal peut habituellement être observée. Il est donc essentiel pour toute expérience requérant une quantification absolue de la concentration de déterminer précisément la visibilité du signal observé dans chacun des milieux concernés. La figure 4 illustre une façon de contourner le problème de visibilité du sodium intracellulaire dans des tubules corticaux de rein de chien. Les tubules rénaux sont insérés dans des fibres de dialyse et péri-fusés par recirculation d'un milieu nutritif oxygéné et contenant du PPP de dysprosium. Une sonde spécialement construite pour permettre la périfusion est employée pour ces mesures [14]. L'intensité du signal du sodium intracellulaire est suivie en fonction du temps alors que la concentration extracellulaire de sodium varie de 137 mM à 65 mM (par substitution du sodium par de la choline) avec retour à 137 mM. On peut voir que l'intensité du signal RMN pour le sodium intracellulaire varie en fonction des changements de concentration extracellulaire. La cinétique de ce changement peut être suivie en temps réel. A la fin de l'expérience, de l'oua-

baïne, un inhibiteur de la (Na, K)ATPase, est ajoutée, ce qui provoque un accroissement du sodium intracellulaire jusqu'à équilibre complet avec le milieu extracellulaire. A ce moment, le signal intracellulaire total correspond à une concentration connue, égale à celle du milieu extracellulaire, et il est possible de recalculer les concentrations intracellulaires de sodium observées avant équilibre. Ce calcul tient compte des facteurs de visibilité RMN. Les concentrations intracellulaires calculées de cette façon correspondent à environ quarante pour cent des concentrations extracellulaires dans ce cas.

Conclusion

Pour plusieurs électrolytes d'intérêt biologique, il est maintenant possible de quantifier par résonance magnétique nucléaire leurs concentrations dans les compartiments intra- et/ou extracellulaires. La RMN est la seule méthode qui permette d'obtenir ces mesures en temps réel et de façon non perturbante. Il est toutefois nécessaire de développer des systèmes permettant de conserver les préparations biologiques dans des conditions stables et de tenir compte des facteurs de visibilité ■

Summary

The application of nuclear magnetic resonance to the study of cellular electrolytes is described. The sensitivity of different nuclei is compared, considering their biological occurrence. Depending on the nucleus observed, discrimination between the intracellular and the extracellular signal can be obtained if (1) the observed species exists in only one compartment, (2) the signal in one compartment is unobservable or (3) a paramagnetic shift reagent is added to the extracellular compartment to shift the signal of the species in this compartment. Quantitative measurements can be complicated by a reduced NMR visibility resulting from linebroadening effects due to different types of interactions. NMR visibility problems occur when the observed species is motion-restricted, as can be the case in the intracellular environment. Examples of applications are given where the nuclei ^{31}P , ^{35}Cl and ^{23}Na have been utilized.

GLOSSAIRE

Noyaux dipolaires et quadrupolaires : Les noyaux dipolaires possèdent un spin $I = 1/2$ et se comportent comme des mini-aimants. Les noyaux quadrupolaires ($I > 1/2$) possèdent une asymétrie de charge électrique et sont susceptibles de donner lieu à des signaux multiples et élargis à cause de l'interaction quadrupolaire et de leur relaxation rapide.

Transformation de Fourier : Opération mathématique qui permet de transformer un signal en fonction du temps en un signal en fonction de la fréquence. En RMN, la transformation de Fourier permet d'obtenir un spectre (échelle de fréquence) à partir d'un signal de précession libre (échelle de temps).

Déplacement chimique : Position d'un signal RMN sur l'échelle des fréquences par rapport à une référence.

Vitesse de relaxation : Vitesse à laquelle un noyau excité retourne à son état d'équilibre.

Mécanisme d'action des substances paramagnétiques : La présence de substances paramagnétiques dans l'environnement d'un noyau crée un champ magnétique faible qui provoque un changement de déplacement chimique du signal RMN de ce noyau.

Anisotropie de déplacement chimique : Variation du déplacement chimique d'un noyau en raison de l'orientation spatiale du noyau par rapport à celle du

champ magnétique principal. Pour un échantillon non orienté, une série de signaux est obtenue, correspondant aux différentes orientations du noyau par rapport au champ.

Susceptibilité magnétique : Rapport entre l'intensité de magnétisation produite dans une substance et l'intensité du champ magnétique appliqué. Comme la susceptibilité magnétique varie selon le milieu, des distorsions du champ magnétique se produisent dans des échantillons non homogènes, provoquant des variations de déplacement chimique et donnant lieu à des signaux élargis.

Périfusion : Recirculation d'un milieu nutritif autour de cellules mécaniquement immobilisées afin de les maintenir viables.