



**HAL**  
open science

# Développement de l'IRM du poumon rehaussée par polarisation dynamique nucléaire : vers l'imagerie de la protéolyse

Angélique Rivot

► **To cite this version:**

Angélique Rivot. Développement de l'IRM du poumon rehaussée par polarisation dynamique nucléaire : vers l'imagerie de la protéolyse. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0274 . tel-02869870

**HAL Id: tel-02869870**

**<https://theses.hal.science/tel-02869870>**

Submitted on 16 Jun 2020

**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.

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE  
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé  
SPÉCIALITÉ : Bioimagerie

Par Angélique RIVOT

**Développement de l'IRM du poumon rehaussée par  
polarisation dynamique nucléaire :  
Vers l'imagerie de la protéolyse**

Soutenue le 03 Décembre 2019

Membres du jury :

Dr Daniel ABERGEL	CNRS, ENS Paris	Président du jury
Pr Serge AKOKA	Université de Nantes	Rapporteur
Dr Florence FRANCONI	Université d'Angers	Examinatrice
Dr Elodie PARZY	Université de Bordeaux	Invitée
Pr Sylvain MARQUE	Université de Marseille	Invité
Pr. Éric THIAUDIERE	Université de Bordeaux	Directeur de thèse



## Remerciements

Aux membres du jury et aux invités, Dr. Daniel Abergel, Pr. Serge Akoka, Dr. Florence Franconi et Pr Sylvain Marque , merci d'avoir accepté de juger mon travail et notamment pour l'attention portée à mes travaux de thèses.

Un grand merci à mon directeur de thèse, le Pr. Eric Thiaudière, qui m'a offert l'opportunité de réaliser cette thèse. Je garderai toujours en exemple ta compétence et la grande qualité de ton travail. Et par ces remerciements je t'assure de mon admiration sincère et de mon plus profond respect.

J'adresse également l'expression de ma gratitude et de mon amitié aux autres membres de l'équipe PDN.

Philippe Mellet, Philippe Massot et Elodie Parzy : merci pour votre soutien à mon égard, vos encouragements et vos conseils qui ont largement contribué à la réalisation de ce projet. Merci Natacha Jugniot : grâce à toi j'ai redécouvert la gastronomie française, tu as été une partenaire de bureau et « in the crime » exceptionnelle.

Je remercie le directeur Dr. Sylvain Miraux pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. J'adresse aussi un merci à l'ensemble des personnes du RMSB, pour leur bienveillance et leur amitié.

A Samuel Bonnet : ces 3 ans n'auraient jamais été pareils sans toi. Merci pour tous ces fous rires, tes conseils et ton soutien.

Et plus personnellement, j'adresse ma reconnaissance à toute ma famille en métropole et en Martinique et à mes amis qui ont cru en moi, encouragé et conseillé et montré un soutien sans faille.

A Sébastien : la thèse est un ascenseur émotionnel et je ne peux que te remercier d'avoir été présent à chaque instant.

A ma mère : je te serai éternellement reconnaissante pour les valeurs que tu m'as inculquée, à savoir la persévérance, l'ambition et bien d'autres qualités qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici.

Encore une fois, un grand merci à vous tous.



*“I never lose, I either win or learn.”*

Nelson Mandela



# Sommaire

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>6</b>
<b>COMMUNICATIONS</b> .....	<b>1</b>
ARTICLES .....	1
CONGRÈS .....	1
<b>RÉSUMÉ DE LA THÈSE</b> .....	<b>2</b>
<b>SUMMARY OF THESIS</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>9</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>14</b>
1.1. LES MALADIES INFLAMMATOIRES PULMONAIRES .....	15
1.1.1. <i>Physiologie de la respiration</i> .....	15
Eléments d'anatomie du poumon .....	15
Mécanisme de protection .....	16
1.1.2. <i>Les pathologies inflammatoires</i> .....	17
Maladies interstitielles pulmonaires .....	17
Mucoviscidose .....	17
Bronchopneumopathie chronique obstructive .....	19
Asthme .....	21
Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe (SDRA) .....	21
1.2. MÉTHODES DE DIAGNOSTIC - PLACE DE L'IMAGERIE .....	22
1.2.1. <i>Diagnostic clinique</i> .....	22
Examens physiologiques : .....	22
Examens cytologiques : .....	22
L'imagerie .....	23
1.2.2. <i>Le rôle de l'imagerie dans les pathologies inflammatoires</i> .....	23
Imagerie par rayons X .....	24
Imagerie par résonance magnétique (IRM) .....	25

1.3.	IMPLICATION DES PROTÉASES DANS LES MALADIES PULMONAIRES - LES PROTÉASES : UNE ÉPÉE À DOUBLE TRANCHANT .....	28
1.3.1.	<i>Famille d'enzymes</i> .....	28
	Les protéases à cystéines.....	29
	Les Métalloprotéinases (MMP).....	30
	Les protéases à sérines .....	30
1.3.2.	<i>Les protéases à sérines du neutrophile</i> .....	31
1.3.3.	<i>L'équilibre protéases / anti protéases</i> .....	32
1.4.	IMAGERIE MOLÉCULAIRE DE LA PROTÉOLYSE .....	34
1.4.1.	<i>Imagerie nucléaire</i> .....	35
1.4.2.	<i>Imagerie optique</i> .....	36
	Fluorescence dans le proche infrarouge (NIRF).....	36
	Bioluminescence (BLI).....	37
1.4.3.	<i>IRM moléculaire</i> .....	38
	Les agents de contraste T1 / T2.....	38
	Fluor 19.....	40
	Imagerie Transfert de Saturation par Echange Chimique (CEST) .....	40
	Hyperpolarisation – Polarisation dynamique .....	41
1.5.	OBJECTIFS .....	50
<b>2.</b>	<b>ELÉMENTS THÉORIQUES DE LA POLARISATION DYNAMIQUE NUCLÉAIRE PAR EFFET OVERHAUSER.....</b>	<b>51</b>
<b>3.</b>	<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>58</b>
3.1.	EQUIPEMENTS EXPÉRIMENTAUX.....	59
3.1.1.	<i>IRM</i> .....	59
3.1.2.	<i>Cavité RPE</i> .....	59
	Conception .....	60
	Ajustements .....	60
	Le montage .....	61
3.1.3.	<i>Spectromètre RPE</i> .....	61
3.2.	DÉVELOPPEMENT DES SÉQUENCES OMRI DU PARENCHYME PULMONAIRE .....	62
3.2.1.	<i>Optimisation de la séquence FSE 3D</i> .....	62
	Chronogramme .....	62
	Sous échantillonnage Keyhole .....	63
3.2.2.	<i>Implémentation de la séquence UTE 3D</i> .....	65
	Séquence d'acquisition .....	65

Trajectoires .....	66
Algorithme de reconstruction.....	68
Application du Keyhole .....	70
3.3.    NITROXYDES .....	71
3.3.1. <i>Les nitroxydes témoins</i> .....	71
3.3.2. <i>Nitroxyde marqueur de l'élastase</i> .....	72
3.3.3. <i>Fréquence de saturation</i> .....	73
3.4.    MODÈLES EXPÉRIMENTAUX .....	75
3.4.1. <i>Modèles in vitro</i> .....	75
Fantôme de résolution.....	75
Fantôme de cinétique .....	75
Lavages Broncho-Alvéolaire .....	76
Fantôme souris.....	76
3.4.2. <i>Expérimentation animale</i> .....	77
<b>4.    RÉSULTATS.....</b>	<b>78</b>
4.1.    EVALUATION DES SÉQUENCES UTE3D ET FSE3D .....	79
4.1.1. <i>Application in vitro</i> .....	79
Séquence FSE3D .....	79
Séquence UTE 3D.....	80
4.1.2. <i>Estimation des T2 et T2* in vivo</i> .....	81
Mesure de T2 dans les poumons .....	82
Mesure T2* dans les poumons.....	82
4.2.    OMRI DU POUMON <i>IN VIVO</i> .....	84
4.2.1. <i>OMRI avec la séquence UTE3D</i> .....	84
4.2.2. <i>OMRI avec la séquence FSE 3D</i> .....	84
Instillation de nitroxydes témoins .....	85
Instillation du substrat de l'élastase Succ-AAPV-nitroxyde .....	86
Instillation du nitroxyde produit.....	87
4.3.    MESURE PAR EFFET OVERHAUSER DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE <i>IN VITRO</i> .....	89
4.3.1. <i>Introduction</i> .....	89
4.3.2. <i>Caractéristiques spectrales des nitroxydes substrat et produit</i> .....	89
4.3.3. <i>Mesure de l'activité protéolytique in vitro</i> .....	90
4.3.4. <i>Cinétique enzymatique sur des lavages broncho-alvéolaires</i> .....	92
4.3.5. <i>Article</i> .....	94

4.4.	DÉTECTION PAR OMRI DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE IN VIVO .....	107
4.4.1.	<i>Activité enzymatique : Dégradation du nitroxyde-substrat par OMRI</i> .....	107
4.4.2.	<i>Activité enzymatique : Formation du nitroxyde-produit par OMRI</i> .....	109
<b>5.</b>	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>111</b>
5.1.	OMRI DE LA SOURIS À 0.2T : ORIGINALITÉ ET LIMITATIONS .....	112
5.2.	IRM 3D DU POU MON : LE CHOIX DE LA SÉQUENCE FSE3D <i>IN VIVO</i> .....	113
5.3.	OMRI DE LA PROTÉOLYSE DANS LES POU MONS DE SOURIS .....	115
5.4.	DIFFICULTÉS RENCONTRÉES .....	117
5.5.	DÉVELOPPEMENTS ULTÉRIEURS : VERS L'IMAGERIE CHEZ L'HUMAIN .....	119
<b>6.</b>	<b>ANNEXE .....</b>	<b>120</b>
6.1.	PROTOCOLE D'INSTILLATION INTRA TRACHÉALE .....	121
6.2.	HOMOLYSE DE L'ALKOXYAMINE.....	124
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>135</b>

# Communications

## Articles

- **An Elastase Activity Reporter for Electronic Paramagnetic Resonance (EPR) and Overhauser-enhanced Magnetic Resonance Imaging (OMRI) as a Line-Shifting Nitroxide**

Jugniot, N.\* Dutttagupta, I.\* **Rivot, A.** Massot, P. Cardiet, C. Pizzoccaro, A. Jean, M. Vanthuyne, N. Franconi, J.M. Voisin, P. Devouassoux, G. Parzy, E. Thiaudière, E. Marque, S.R.A. Benthaher A. Audran, G. Mellet, P.. *Free Radical Biology and Medicine*, 126, 101–112 (2018).

- **Enzymatic Triggering of C—ON bond Homolysis of Alkoxyamines**

Audran, G. Bosco, L. Brémond, P. Jugniot, N. Marque, S. Massot, P. Moussounda Koumba, T. Parzy, E. **Rivot, A.** Thiaudiere, E. Voisin, P. Wedl, C. Yamasaki, T. Mellet, P.. (2019) *Organic Chemistry*.

## Congrès

**Société Française de Résonance Magnétique en Biologie et Médecine (SFRMBM)** – Bordeaux, France, Juin 2017

**11th Young Scientist Symposium** – Chemistry and Biology – Pessac, France, Mai 2018

**Gordon Research Conference** – Proteolytic enzymes and their inhibitors – Barga, Italie, Juin 2018

**International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM)** – Paris, France, Juin 2018

**5th Russian Organic Chemistry Conference ROCC5** – Vladikavkaz, Russie, Septembre 2018

**European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology (ESMRMB)** – Rotterdam, Pays-Bas, Octobre 2019

## Résumé de la thèse

### Développement de l'IRM du poumon rehaussée par polarisation dynamique nucléaire : vers l'imagerie de la protéolyse

Les maladies inflammatoires pulmonaires telles que la mucoviscidose et la BPCO, ont pour point commun un influx important de neutrophiles qui libèrent des protéases responsables des lésions tissulaires et de la perte progressive de fonction. À ce jour, il n'existe aucune méthode permettant d'évaluer l'activité des protéases dans le poumon *in vivo*. Une telle méthode permettrait un diagnostic précoce de tout déséquilibre protéase / inhibiteur bien avant la détection des lésions pulmonaires par des techniques d'imagerie anatomique ainsi que l'évaluation de thérapies avec des inhibiteurs de protéases. L'IRM rehaussée par Polarisation dynamique nucléaire (PDN) est une approche possible pour révéler de telles activités enzymatiques en utilisant des nitroxydes spécifiques. Cependant, l'imagerie du poumon par IRM est encore aujourd'hui exigeante, en raison des propriétés intrinsèques à l'organe. Dans la nécessité d'obtenir du signal dans le poumon en IRM, une séquence radiale est souvent privilégiée. En effet, les trajectoires radiales bénéficient de nombreux avantages comme leur faible sensibilité aux artefacts de mouvements ainsi que la possibilité de sous-échantillonner les acquisitions. Ainsi, l'objectif de cette thèse est de développer une séquence 3D à Temps d'Echo Ultra court sur un nouveau système IRM bas champ (0.2T) et de la comparer à une séquence robuste utilisant l'écho de spin. Les deux méthodes ont été implémentées au système afin d'obtenir des images en 3D en un temps d'acquisition limité. Après leur évaluation *in vitro*, leur utilisation *in vivo* chez la souris donnent accès à la biodistribution des nitroxydes dans le poumon, dont un substrat de l'élastase du neutrophile. L'IRM rehaussée a par ailleurs permis d'évaluer *in vitro* les activités enzymatiques de protéases à sérine dans le cas de poumons infectés.

Mots clés : IRM – PDN – Protéolyse – Poumon



## Summary of thesis

### **Lung MRI Development enhanced by dynamic nuclear polarization: Toward proteolysis imaging**

Pulmonary inflammatory diseases such as cystic fibrosis and COPD, have in common a high influx of neutrophils that secrete proteases responsible for tissue injury and the progressive loss of lung function. To date there is no method able to assess lung enzyme activity *in vivo*. Such a method would allow an early diagnostic of any protease/inhibitor imbalance long before the detection of pulmonary lesions by anatomical imaging methods. Lungs function could thus be preserved with protease inhibitors. MRI enhanced by dynamic nuclear polarization (DNP) is an approach that reveal proteolytic activity through specific nitroxide. However, lung imaging by MRI is demanding, because of intrinsic properties. In order to obtain signal in the lung by MRI, a radial sequence imaging is often favorable. Indeed, radial trajectories benefit from various advantages like their low sensitivity to motion artefacts as well as the opportunity to highly undersample acquisitions. Thus the aim of this thesis was to develop a 3D Ultra Short Echo Time sequence on a new low field MRI system (0.2T). This sequence has been compared to a robust spin echo sequence. Both methods have been implemented in the system to obtain 3D images in a limited acquisition time. After their *in vitro* evaluation, their *in vivo* use in mice gives access to the biodistribution of nitroxides in the lung, like substrate of neutrophil elastase. Enhanced MRI allowed *in vitro* monitoring of the enzymatic activities of serine proteases in the case of infected lungs.

Key words : MRI – DNP – Proteolysis – lung



## Liste des figures

Figure 1 : Arbre bronchique d'un poumon humain .....	15
Figure 2: Comparaison d'une bronche dans les conditions physiologique et de mucoviscidose .....	19
Figure 3: Représentation des affectations liées à la BPCO.....	20
Figure 4 : Distribution du Xénon 129 dans les poumons d'un sujet atteint de BPCO et d'un sujet sain .....	27
Figure 5 : Principe d'une réaction hydrolytique. ....	28
Figure 6 : Répartition des protéases chez l'homme et la souris (Puente et al., 2003).....	29
Figure 7 : Imagerie NIRF d'une tumeur microscopique. (Weissleder et al., 1999). ....	37
Figure 8 : Mécanisme de formation de la macromolécule GdNP pour la cartographie de l'activité des caspase-3/7.. ....	39
Figure 9 : Description du protocole d'imagerie CEST.....	41
Figure 10 : Polarisation du Xenon par pompage optique à échange de spin. ....	43
Figure 11 : Spectres hyperCEST du $^{129}\text{Xe}$ hyperpolarisé en présence de CB6-rotaxane et de MMP2. ....	44
Figure 12 : Principe de la polarisation induite par parahydrogène. ....	45
Figure 13 : Protonation d'un radical sensible au pH (Efimova et al., 2011).....	47
Figure 14 : Spectres RPE. ....	48
Figure 15 : Diagramme des états selon leurs niveaux d'énergie et des probabilités de transition d'un système à deux spins. ....	53
Figure 16 : Photographies de l'IRM 0.194T et de la cavité résonante RPE .....	59
Figure 17 : Mode TE011 dans la cavité RPE.....	60
Figure 18 : Montage expérimental du banc de PDN.....	61

Figure 19 : Chronogramme de la séquence FSE 3D et le mode de remplissage du plan de Fourier.....	63
Figure 20 : Principe du keyhole .....	64
Figure 21 : Chronogramme de la séquence UTE 3D et le mode de remplissage du plan de Fourier.....	66
Figure 22: Remplissage radial .....	67
Figure 23 : Représentation de la procédure de remaillage.....	69
Figure 24 : Les nitroxydes témoins.....	71
Figure 25 : Réaction protéolytique de Meo-Suc-AAPV-nitroxyde cétone par l'élastase du neutrophile. ....	72
Figure 26 : Spectres RPE du substrat et du produit .....	73
Figure 27 : Images acquises par FSE 3D .....	79
Figure 28 : Stratégie Keyhole avec effet Overhauser pour l'acquisition UTE3D.....	81
Figure 29 : Mesure du T2 dans le poumon de souris .....	82
Figure 30 : Mesure du T2* dans le poumon de souris .....	83
Figure 31 : Images de magnitude et de phase de poumons de souris acquises avec la séquence UTE3D sous-échantillonnée. ....	84
Figure 32 : Coupes coronales de poumons de souris saines, après instillation de nitroxyde témoins.....	85
Figure 33 : Structures moléculaires des nitroxydes témoins .....	86
Figure 34 : Coupes coronales de poumons de souris saines, après instillation intratrachéale de substrat Succ-AAPV-nitroxyde .....	87
Figure 35 : Balayage fréquentiel pour la détermination des fréquences de saturation RPE optimales pour les expériences OMRI.....	89
Figure 36 : Protéolyse du substrat mesurée par OMRI.....	91

Figure 37 : Détection de la protéolyse du substrat Succ-AAPV-nitroxydes dans des capillaires contenant des LBA de souris par OMRI-2D.....	92
Figure 38 : Courbes représentatives des rehaussements mesurés dans les LBA de souris.....	93
Figure 39 : Coupes coronales de poumons de souris LPS après instillation intratrachéale de nitroxyde- substrat. ....	107
Figure 40 : Comparaison de l'effet Overhauser entre les souris saines et LPS. ....	108
Figure 41: Concentrations du produit mesurées par spectroscopie RPE. ....	109

## Liste des tableaux

Tableau 1: Paramètres d'acquisition de la séquence FSE 3D .....	63
Tableau 2 : Caractéristiques des nitroxydes témoins .....	71
Tableau 3 : Paramètres RPE du substrat et du produit.....	73
Tableau 4 : Récapitulatifs des gains mesurés pour différents nitroxydes instillés à différentes concentrations. ....	86

## Liste des abréviations

A1AT	Alpha-1-Antitrypsine
BPCO	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
CEST	Transfert de Saturation par Echange Chimique
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
CG	Cathepsine G
CT	Tomodensitométrie
DE-CT	Tomodensitométrie à double énergie
FOV	Champ de vue
FSE	<i>Fast Spin Echo</i>
IDL	Maladies interstitielles pulmonaires
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
KO	Non expression d'un gène
LBA	Lavage Broncho-Alvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
MMP	Métalloprotéinase
NE	Elastase du Neutrophile
NIRF	Fluorescence dans le proche infrarouge
OMRI	Imagerie par Résonance Magnétique rehaussée par effet Overhauser
PCA	2,2,5,5-tetramethyl-3-carboxylpyrrolidine-N-oxyl
PDN	Polarisation Dynamique Nucléaire
PHIP	Polarisation induite par parahydrogène
PR3	Protéinase 3
RF	Radiofréquence
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROI	Région d'intérêt
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
SDRA	Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe
SNR	Signal sur bruit
TE	Temps d'Echo
TEMP	Tomographie par Emission Mono Photonique

TEP	Tomographie par Emission de Positon
TIMP	Inhibiteur de Métalloprotéinase
TR	Temps de Répétition
TXO	4-oxo-tempo
UTE	Ultra court Temps d'Echo
WT	Type sauvage





# AVANT-PROPOS

Les maladies inflammatoires pulmonaires représentent un problème majeur socioéconomique et de santé, dont l'ampleur croît au fil des années. Parmi ces pathologies respiratoires sont inclus la mucoviscidose, la sarcoïdose, l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Le journal *The Lancet Respiratory Medicine* (Soriano et al., 2017) a d'ailleurs révélé qu'environ 3 millions de décès lié à la BPCO ont été recensés en 2015, classant cette maladie chronique au 3<sup>ème</sup> rang des causes de mortalité dans le monde, selon l'Organisation Mondiale de la Santé.

Les facteurs déclencheurs de ces inflammations peuvent être d'origines diverses : lié à l'environnement extérieur comme le tabac ou la pollution (Wright and Churg, 1995), un traumatisme, ou encore suite à une mutation génétique. Un dénominateur commun à ces maladies est l'afflux accru de neutrophiles. Sur le site de l'inflammation, ces neutrophiles déchargent des enzymes protéolytiques, également appelées protéases, dans l'environnement extracellulaire. Etroitement régulées dans des conditions physiologiques, ces enzymes sont surexprimées sur le site inflammatoire. Ceci a pour conséquence d'entraîner un défaut de l'équilibre protéase / anti protéase causant des lésions tissulaires puis progressivement une perte fonctionnelle du poumon. Ces maladies sont décelées bien trop tardivement, c'est-à-dire une fois le stade de dégradation anatomique atteint. Les méthodes de diagnostic en radiologie clinique conventionnelle, ne peuvent à l'heure actuelle fournir les éléments de diagnostic précoce fondés sur les processus moléculaires sous-tendant la pathologie. Aucune étude n'a, à ce jour, été développée pour cartographier les changements moléculaires avant toute altération de l'organe. La mise en place d'un protocole soutenu par une technique d'imagerie fiable permettrait une prise en charge précoce de la maladie et notamment d'établir un traitement efficace et personnalisé avec des inhibiteurs de protéases tout en ayant une visualisation de l'évolution de l'activité enzymatique délétère.

Les approches d'imagerie moléculaire, comme l'imagerie nucléaire, la tomodensitométrie et l'imagerie optique, ont largement confirmé leur intérêt dans la localisation et la caractérisation de processus métabolique. Néanmoins, les faibles résolutions (imageries nucléaire et optique) ou l'innocuité (tomodensitométrie) entravent ces modalités. Dans ce contexte l'IRM semble particulièrement appropriée, aussi bien par sa résolution spatiale que par son contraste élevé des tissus mous. Elle fournit des images anatomiques de qualité, notamment en 3D grâce à son fort pouvoir de pénétration. Cependant, ses faibles sensibilité et spécificité moléculaire ainsi qu'un temps d'acquisition relativement long, font

obstacle à cette modalité, rendant l'imagerie de l'activité enzymatique associée à des espèces diluées difficile voire impossible.

Au « Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques de Bordeaux » une approche unique a été développée en 2005, une IRM rehaussée par Polarisation Dynamique Nucléaire (PDN). La PDN est un phénomène qui rehausse la sensibilité IRM. C'est une expérience à double résonance magnétique, reposant sur l'effet Overhauser. Cette technique implique la saturation électronique de l'électron non apparié d'un radical libre non toxique, comme un nitroxyde. Un transfert d'aimantation se réalise donc de l'électron libre aux protons de l'eau environnant, ce qui est à l'origine du rehaussement du signal IRM. L'efficacité du système a été démontrée sur des applications *in vitro* (Mellet et al., 2009) et aussi dans des études *in vivo* (Massot et al., 2012). Par greffage sur un nitroxyde, un substrat peptidique reconnu par la protéase cible rend possible l'imagerie de la protéolyse (Koonjoo et al., 2014; Parzy et al., 2013).

Cette thèse est au carrefour de différentes disciplines : la physique de l'IRM, la biochimie et la médecine. Le manuscrit introduira le contexte physiopathologique des affections inflammatoires pulmonaires pour se concentrer ensuite sur les aspects méthodologiques en IRM et sur les sondes chimiques utilisées. Les premiers résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* seront discutés pour envisager des perspectives réalisables.

# 1. Introduction

## 1.1. Les maladies inflammatoires pulmonaires

A l'interface entre l'environnement aérien extérieur et l'organisme, les poumons sont exposés à différentes agressions palliées par un système de défense. Toutefois, celui-ci peut se révéler insuffisant dans le cas de diverses maladies inflammatoires.

### 1.1.1. Physiologie de la respiration

#### *Eléments d'anatomie du poumon*

Les poumons sont les organes centraux de l'appareil respiratoire qui assurent la saturation en oxygène de l'hémoglobine et l'élimination du gaz carbonique au travers d'un système tubulaire – larynx, trachée et bronches.

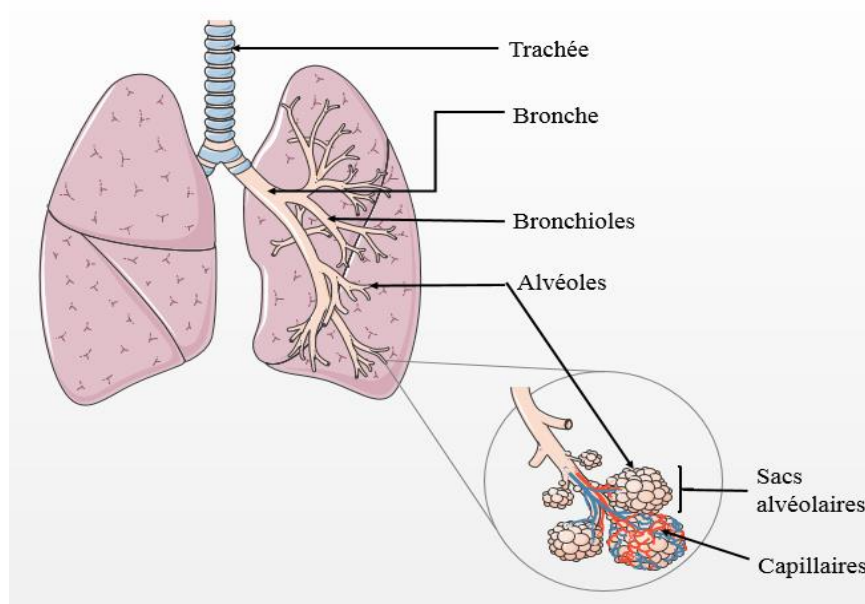


Figure 1 : Arbre bronchique d'un poumon humain

Ils forment deux masses spongieuses qui sont insérées dans la cage thoracique et dont la base est soutenue par le muscle diaphragmatique. Chez l'homme, le poumon droit, plus volumineux, présente trois lobes (supérieur, moyen, inférieur) ; Celui de gauche, ne possède que deux lobes (supérieur et inférieur) et est doté d'une excavation, laissant de la place au cœur. Chez la souris, la configuration pulmonaire est différente (Meyerholz et al., 2018). Le poumon gauche du rongeur, constitue à lui seul un lobe et le droit a la particularité de posséder un lobe supplémentaire. Ce lobe, dit accessoire, est situé en position postérieure au cœur.

L'architecture des poumons leur confère un aspect d'arbre ramifié avec pour tronc, la trachée. Cette dernière se sépare en deux bronches souches, une par poumon, et qui se subdivisent ensuite successivement en bronches de plus en plus étroites (figure 1). Le stade le plus petit est la bronchiole. Ce système tubulaire ramifié aboutit à des millions de sacs alvéolaires.

C'est au niveau des alvéoles terminales que l'échange gazeux se réalise, puisque, étroitement séparées du réseau de capillaires par une fine paroi cellulaire (West and Luks, 2017). L'oxygène inspiré passe rapidement au travers de cette barrière et par diffusion, pénètre dans les voies sanguines. Le dioxyde de carbone exécute simultanément le chemin inverse avant d'être expulsé de l'organisme lors de l'expiration. La caractéristique du poumon est sa variation volumique au cours du cycle respiratoire. Les propriétés élastiques du tissu pulmonaire, lui permettent d'atteindre une capacité volumique d'air de 1mL chez la souris à 6000mL chez l'homme (Irvin and Bates, 2003).

Chaque inspiration est une porte d'entrée aux agents pathogènes volatiles comme les polluants, les poussières, les virus et les bactéries, pouvant endommager les poumons qui possèdent un système de protection efficace.

### *Mécanisme de protection*

Le système muco-ciliaire est la première ligne de défense de l'appareil respiratoire. L'ensemble des poumons est tapissé d'une barrière protectrice, une fine couche de mucus sécrétée par des glandes muqueuses. Ce liquide visqueux d'aspect translucide (semblable à du blanc d'œuf) est composé d'eau en majorité et d'une large variété d'agents antibactériens (Fahy and Dickey, 2010). Il a un rôle essentiel dans la lubrification de l'air et dans la protection des voies respiratoires (Girod et al., 1992; Lillehoj and Kim, 2002). Il piège tous les aéro-contaminants qui rentrent dans le poumon lors de l'inspiration, tout en limitant la prolifération micro-bactérienne. Ce mucus contaminé est balayé hors de l'organisme sous l'action de cils présents à la surface de cellules épithéliales ciliaires (Knowles and Boucher, 2002). Les cils balayent le mucus en direction de la gorge pour ensuite être éliminé hors de l'organisme via le système digestif ou la toux.

Un autre système de protection, est l'inflammation. C'est un mécanisme réactionnel de défense essentiel et limité dans le temps et l'espace. L'inflammation entraîne l'accumulation et l'activation d'une grande quantité de cellules immunitaires comme les lymphocytes, les neutrophiles, et les macrophages (Samet and Cheng, 1994). Lorsqu'un corps étranger atteint le tissu épithélial, tous les mécanismes de protection se mettent en

route. Les glandes muqueuses trachéo-bronchiques produisent davantage de mucus et sécrètent une variété de cytokines (des médiateurs pro-inflammatoires) pour recruter des cellules immunitaires sur le site de l'inflammation.

L'intensité et la durée de la réponse inflammatoire sont conditionnées par la nature (infectieuse, chimique, agression physique extérieure, génétique), l'agressivité et la sensibilité à l'agent exogène. Ces facteurs peuvent conduire à l'apparition de maladies.

### 1.1.2. Les pathologies inflammatoires

#### *Maladies interstitielles pulmonaires*

Les maladies interstitielles pulmonaires ou ILD (*Interstitial lung disease*) représentent un ensemble hétérogène d'affections pulmonaires progressives. Parmi ces affections, la sarcoïdose et la fibrose idiopathique pulmonaire représentant plus de 50 % de tous les IDL, sont les plus mortelles (Schwarz and King, 2011).

La sarcoïdose se manifeste sous la forme d'amas de cellules immunitaires touchant de nombreux organes tels que les yeux (Pasadhika and Rosenbaum, 2015), le cœur (Kandolin et al., 2011), le cerveau (Agnihotri et al., 2014), le foie (Ennaifer et al., 2016), la peau (Mañá and Marcoval, 2012), et bien d'autres. Mais ce sont principalement les poumons les plus atteints (Lynch et al., 1997).

Un autre changement phénotypique qui se manifeste chez les personnes atteintes d'IDL, est la présence de fibrose (accumulation de tissu conjonctif) au niveau des alvéoles et de la barrière alvéole-capillaire (Bourke, 2006).

L'étiologie des IDL est encore mal connue, mais les facteurs génétiques et environnementaux sont toujours suspectés. Cliniquement, le patient souffre alors d'essoufflement, présente une aptitude réduite à l'effort et une toux sèche (European Lung Foundation).

#### *Mucoviscidose*

La fibrose kystique est une maladie génétique plus communément connue sous le nom de mucoviscidose. Selon l'association française « vaincre la muco », 7000 personnes sont atteintes de cette pathologie et chaque année 200 nouveau-nés sont diagnostiqués positifs.

Chez le nouveau-né, la mucoviscidose se manifeste par des troubles pancréatiques (Gibson-Corley et al., 2016), digestifs (van der Doef et al., 2011) et pulmonaires. L'enfant souffre d'un retard d'élimination du méconium (première selle avant toute alimentation). En 1953, Di Sant'Agnese P remarque un taux anormalement riche en chlorure dans la sueur des personnes atteintes (Sant'agnese et al., 1953) et propose une méthode de diagnostic, le test de la sueur. Un test qui, aujourd'hui, est toujours en vigueur.

Les personnes atteintes par la fibrose kystique pulmonaire, ont les bronches obstruées par un épais mucus. Pour comprendre l'origine de l'épaississement de ce mucus, il faut remonter en 1989. Cette année fut l'année pivot dans la compréhension de la maladie, puisque Riordan et son équipe (Riordan et al., 1989) ont identifié le gène responsable de la pathologie, mettant en avant le lien génotype / phénotype. Cette découverte a ouvert la voie à la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Une mutation du gène CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), notée  $\Delta F508$  et située sur le chromosome 7, est à l'origine de la mucoviscidose. Le gène CFTR code pour la protéine membranaire CFTR des cellules épithéliales de différentes muqueuses. La protéine agit comme un pore transmembranaire ayant un système d'ouverture et fermeture très régulé. Il transporte les ions chlorures à travers la membrane plasmique de la cellule épithéliale, créant une osmose entre les milieux intra et extra cellulaires (figure 2A). Dans le cas pathologique, les ponts n'assurent plus leur rôle de transporteur trans-épithélial. Les ions chlorure restent bloqués dans les cellules, induisant une réduction de la teneur en eau du mucus (figure 2B). Cette déshydratation augmente la viscosité du liquide bronchique rendant difficile les battements ciliaires. Le mucus bien trop épais, adhère à la surface épithéliale, obstrue les bronches et entraîne également une dérégulation du pH local (Hatton et al., 2013; Tang et al., 2016). Le milieu étant acide, l'environnement favorise la colonisation bactérienne (*Pseudomonas aeruginosa*) des voies respiratoires (May et al., 1991).



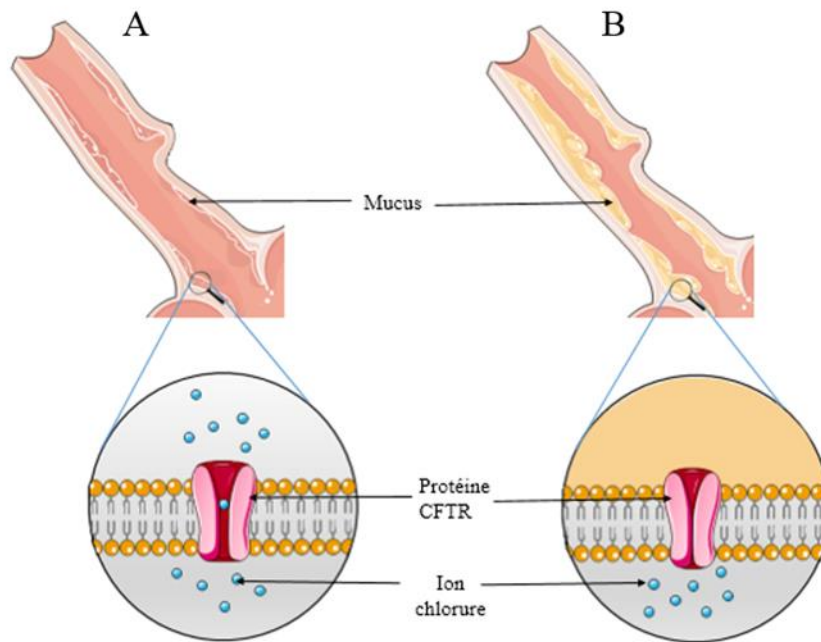


Figure 2: Comparaison d'une bronche dans les conditions physiologique (A) et de mucoviscidose (B).

- A) La protéine CFTR, assure le passage de l'ion chlorure à travers la membrane permettant la fluidification du mucus.
- B) Une mutation du gène CFTR provoque la fermeture de la protéine empêchant l'osmose en ion chlorure de part et d'autre des cellules épithéliales. Le mucus devient visqueux et épais.

Généralement, les patients décèdent suite aux complications infectieuses qui découlent de la maladie, plutôt que de la maladie en elle-même. Grâce aux progrès de la recherche scientifique, l'espérance de vie est passée de 5 ans dans les années 60 à 40 ans aujourd'hui, selon l'Inserm.

### *Bronchopneumopathie chronique obstructive*

La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est actuellement considérée comme l'une des maladies les plus mortelles. En 2015, 3.2 millions de personnes sont décédées dans le monde (Soriano et al., 2017) suite à cette pathologie. Elle prend chaque année de plus en plus d'ampleur. Effectivement, en 2000 elle était la 5<sup>ème</sup> cause de mortalité (World Health Organisation), et pour 2030, les experts prévoient qu'elle figurera au 3<sup>ème</sup> rang mondial (OMS, 2019).

La BPCO provoque une diminution de la fonction pulmonaire et de la qualité de vie. Une toux chronique, une importante expectoration et des difficultés respiratoires persistantes

sont les résultats de lésions emphysémateuses et de bronchite chronique (West, 1995). Une représentation visuelle de ces affectations est illustrée par la figure 3. L'emphysème est causé par un élargissement des espaces aériens et la destruction des parois cellulaires des alvéoles (Voelkel et al., 2011). La bronchite chronique fait suite à une excessive production de mucus (Lahousse et al., 2017), réduisant la lumière des bronches. La BPCO se traduit en conséquence par une réduction du calibre des bronches et d'une perte d'élasticité du tissu pulmonaire (Thumerel, 2015). Les alvéoles pulmonaires ne sont plus normalement ventilées et se détruisent progressivement.

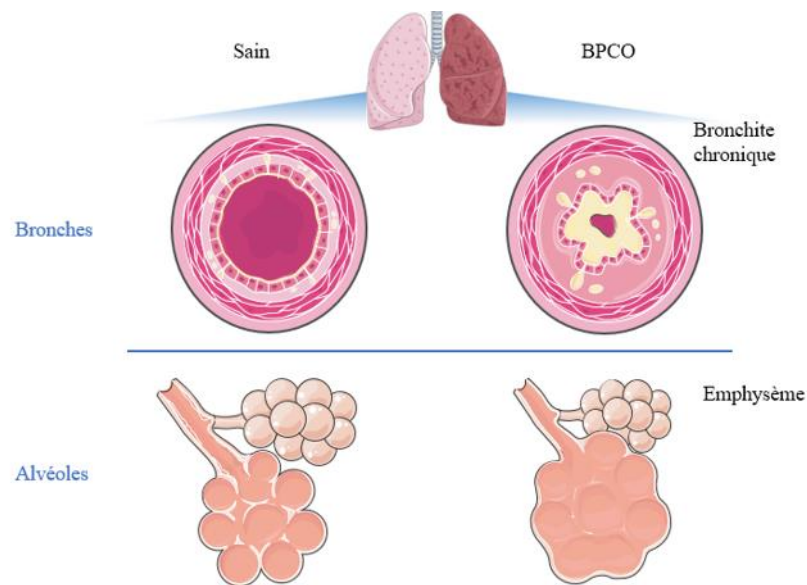


Figure 3: Représentation des affectations liées à la BPCO.

La bronchite chronique est un excès de production de mucus qui réduit la lumière des bronches.

L'emphysème correspond à la rupture de la membrane alvéolaire élargissant l'espace aérien.

Cette pathologie est donc progressive et est associée à une réponse inflammatoire suite à l'inhalation d'éléments toxiques. Des facteurs environnementaux peuvent induire le développement de la maladie, comme la pollution atmosphérique, des pathogènes viraux ou bactériens, mais c'est principalement le tabagisme qui est mis en cause. Le facteur génétique peut aussi être un déclencheur de BPCO. C'est le cas si le malade présente une déficience de la protéine  $\alpha$ -1 antitrypsine (Senn et al., 2005; Silverman and Sandhaus, 2009) dont le rôle est présenté dans la section **1.3.3**.

## *Asthme*

Tout comme la BPCO, l'asthme est une maladie chronique due à une inflammation des bronches, mais se distingue par une possible réversibilité de l'obstruction des voies aériennes (Barnes, 2006; McCracken et al., 2017). D'après l'Inserm, en 2015, la maladie concernait 4 millions de français.

Cette atteinte pulmonaire se révèle par des crises récurrentes durant lesquelles la respiration est pénible et sifflante. Une personne asthmatique est particulièrement sensible à divers stimuli comme la fumée de cigarette, la pollution et autres irritants atmosphériques. Les crises peuvent se déclencher à cause d'un effort physique ou d'un simple fou rire.

Physio-pathologiquement, les muscles lisses bronchiques restent en permanence contractés. A cela, une hypersécrétion anormale de mucus, épais et collant, tapisse la paroi tissulaire, réduisant le diamètre des bronches (Mims, 2015), ce qui gêne le passage de l'air et peut même fermer de nombreuses voies aériennes.

## *Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe (SDRA)*

Toutes les inflammations pulmonaires ne sont pas toujours dues à un problème génétique ou un facteur environnemental. Le syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA) fait suite à un traumatisme pulmonaire, un choc, une septicémie ou encore une pneumonie (Ragaller and Richter, 2010).

Défini pour la première fois en 1967 par Ashbaugh et ses collègues (Ashbaugh et al., 1967), puis repris en 2012 (The Berlin Definition, 2012), la maladie se déclare par une atteinte de la structure de la membrane alvéole-capillaire entraînant le développement d'œdème pulmonaire.

Les signes cliniques de SDRA sont l'essoufflement, une dyspnée, une hypoxémie et une insuffisance respiratoire (Matthay et al., 2012; Ware, 2006).

## 1.2. Méthodes de diagnostic - Place de l'imagerie

Le diagnostic clinique des maladies inflammatoires pulmonaires, commune à toutes les autres maladies, est l'aboutissement d'une démarche d'investigation. Ce diagnostic est dans un premier temps soigneusement basé sur les antécédents, la présence de symptômes et l'évaluation de l'obstruction des voies respiratoires. Différents examens (King, 2005) sont réalisés pour comprendre et confirmer la maladie.

### 1.2.1. Diagnostic clinique

#### *Examens physiologiques :*

- Le moment clé en cas de maladies inflammatoires des poumons est l'**auscultation**. Réalisée à l'aide d'un stéthoscope, elle permet l'analyse des sons émis par les organes thoraciques. Des bruits adventices pulmonaires tels que des crépitements pendant l'inspiration (Reichert et al., 2008) sont des signes indiquant la présence d'une pathologie.
- Une épreuve fonctionnelle respiratoire permet l'évaluation objective, atraumatique et reproductible de la fonction ventilatoire. La **spirométrie** est le test à privilégier. C'est le « gold standard » (Pauwels et al., 2001) pour diagnostiquer la BPCO. Le test de spirométrie mesure le volume total d'air que le patient peut expirer de force (FVC) sur un long souffle, et le volume d'air qu'il peut expirer (FEV) durant la première seconde d'expiration, toujours en forçant. Un taux FEV / FVC inférieur à 70% est révélateur d'une obstruction pulmonaire.

#### *Examens cytologiques :*

Les examens cytologiques à partir de fluides biologiques sont des pratiques courantes mais ne sont pas réalisables en tant qu'outil clinique de routine pour évaluer le dosage immunologique. Ce sont des procédures invasives qui consistent à introduire dans la trachée, puis les bronches, un petit tuyau souple muni d'une fibre optique permettant de visualiser directement la muqueuse bronchique et d'effectuer des prélèvements biologiques.

- **Biopsies** : Examen chirurgical avec le prélèvement d'échantillon tissulaire qui est analysé par microscopie.

- **Lavages Broncho Alvéolaires (LBAs) :** Instillation d'une solution saline au travers des voies respiratoires, dans l'espace alvéolaire. Et récupération de cette de solution contenant en plus des cellules et des substances solubles.

Les examens cytologiques sont de puissantes approches pour l'identification des processus biologiques qui découlent des maladies inflammatoires et apportent également des éléments décisifs pour l'établissement d'un diagnostic. Ils révèlent la présence d'inflammation caractérisée par une altération du tissu épithélial (Amin et al., 2003) et une augmentation du nombre de cellules inflammatoires. Entre autre, la présence de neutrophiles en quantité excessive (Gidaris et al., 2010; Sly et al., 2009; Van Hoecke et al., 2017) et un taux anormal de protéases.

### *L'imagerie*

Le troisième examen d'exploration pulmonaire est l'**imagerie**. Elle joue un rôle complémentaire dans l'établissement du diagnostic. Elle apporte de la précision et aide au suivi de l'évolution de la maladie.

#### 1.2.2. Le rôle de l'imagerie dans les pathologies inflammatoires

Bien que les examens cytologiques permettent déjà de poser un diagnostic préliminaire, la technique d'imagerie apporte une plus-value. Le diagnostic n'est souvent posé qu'en mettant en corrélation les symptômes cliniques, les résultats cytologiques et l'imagerie. L'imagerie est donc un outil pour le praticien pour localiser les zones atteintes des poumons, d'analyser la fonction pulmonaire et de confirmer son diagnostic avec un degré raisonnable de confiance. De plus, l'évaluation des manifestations phénotypiques aide à aborder la manière de traiter la maladie et favorise le suivi de l'évolution.

Une grande variété de méthodes d'imagerie peut être utilisée pour étudier le système pulmonaire, y compris celles qui reposent sur l'absorption tissulaire des rayons X (radiographie et tomodensitométrie), ou encore la densité protonique (imagerie par résonance magnétique : IRM).

### *Imagerie par rayons X*

La radiographie est la plus ancienne et la plus répandue des méthodes d'imagerie du poumon. Elle est utilisée en test initial afin d'apporter une première image en 2 dimensions. Sur l'image projetée, toutes les structures anatomiques sont superposées les unes sur les autres. Tout ce qu'il est possible de tirer de ces images, est l'implication des lobes pulmonaires dans la pathologie. Cette technique de base manque de sélectivité et de spécificité (Wielpütz et al., 2014) aux anomalies tissulaires, c'est pourquoi elle a été reléguée au second plan par des techniques plus performantes.

La tomodensitométrie (« scanner » ou CT) pulmonaire est sans doute l'examen d'imagerie médicale le plus couramment pratiqué. C'est la technique de première intention pour obtenir une image 3D et des informations anatomiques des poumons.

Les principes de fonctionnement de ces appareils sont semblables. Un faisceau de rayons X (de 120 keV d'énergie) créé par une source externe, passe au travers du corps du patient. En fonction de leur densité, les radiations X traversent plus ou moins les tissus et s'impriment sur un film argentique (radiographie) ou sont détectées par de multiples détecteurs numériques (tomodensitométrie). L'atténuation est mesurée selon l'unité de Hounsfield comprise entre 0 (noir) et 100 HU (blanc). Un tissu de forte densité tel que l'os absorbe totalement les rayons X et apparaîtra blanc sur image.

Sur un cliché d'imagerie, les poumons sont facilement reconnaissables. Ils ont la particularité d'être transparents aux rayons X du fait de leur très faible densité tissulaire. Ils apparaissent donc noirs. En présence d'une maladie inflammatoire, les œdèmes, les fibroses et les emphysèmes (Campos and Diaz, 2018) sont facilement visualisables par contraste avec le tissu pulmonaire sain. D'ailleurs, le scanner est considéré comme la technique de référence pour l'identification des changements structurels du tissu pulmonaire chez les personnes atteintes de SDRA (Ball et al., 2017) et de mucoviscidose (Davis et al., 2007).

La tomodensitométrie a été pendant longtemps considérée comme étant une simple technique d'imagerie anatomique. Cette modalité a pourtant évolué au cours des décennies afin de pouvoir réaliser de l'imagerie fonctionnelle. Le système tomodensitométrie à double énergie (ou DE-CT *Dual Energy-CT*) est équipé de deux tubes à rayons X de basse et haute énergie (80 et 140 keV) (Kong et al., 2014).

Par le biais de cette technique, l'imagerie de ventilation utilise le gaz noble, Xénon 129, pour jouer le rôle de contraste gazeux. Dans son article, Park (Park et al., 2010) a décrit le protocole de ventilation. L'examen se déroule en trois étapes durant lesquelles les patients effectuent de multiples apnées. Dans un premier temps, suite à l'installation du sujet dans la machine, une première image est obtenue avec un simple scanner. Durant la deuxième étape,

le patient respire un mélange gazeux composé à 30% de Xénon et 70% d'oxygène. Au bout de 1min d'inhalation, lorsque la concentration en Xénon est considérée maximale, une deuxième image est acquise, cette fois avec le DE-CT. Et pour finir le protocole, un dernier scan est réalisé après 2min d'inhalation d'oxygène à 100%. A chaque acquisition d'image, le sujet doit retenir sa respiration.

Avec cette méthode, DE-CT permet de générer une cartographie de la ventilation (Kang et al., 2010). La répartition est généralement uniforme chez le sujet sain, et des disparités sont visibles chez le patient malade.

### *Imagerie par résonance magnétique (IRM)*

L'IRM est une technique fondée sur la réponse des protons  $^1\text{H}$  de l'eau, contenus naturellement dans l'organisme et soumis à un champ magnétique extérieur ainsi qu'à une excitation électromagnétique. Le signal du proton en IRM est directement proportionnel à la densité protonique du milieu étudié. Or, à cause de son architecture complexe, seuls 30% du poumon interviennent dans la génération du signal (Kauczor et al., 2009) et les 70% restant sont de l'air. Ces conditions rendent l'IRM du poumon difficile et affectent la qualité de l'image. Les principales difficultés sont :

- **Une faible densité protonique pulmonaire.** La pauvre teneur en protons, renvoie aux poumons un rapport signal sur bruit (SNR) intrinsèque relativement faible comparé aux autres tissus. Pour obtenir une image de qualité, il faut faire un compromis entre résolution spatiale et temps d'acquisition. Le SNR est proportionnel à la taille du voxel. L'acquisition d'images permettant la détection de structures fines et de petites lésions impose des temps d'acquisition rédhibitoires en pratique clinique courante.
- **Une hétérogénéité magnétique de l'environnement.** L'air (paramagnétique) et les tissus (diamagnétique) ont une différence de susceptibilité magnétique de 8 ppm (Wild et al., 2012). A l'interface de ces 2 éléments aux propriétés magnétiques différentes, comme au niveau des alvéoles, il se produit une distorsion microscopique et locale du champ magnétique statique. Ce problème se manifeste par des artéfacts de susceptibilité magnétique visualisables sur les images acquises. De plus, cette hétérogénéité est responsable d'une forte perte de signal au cours de son acquisition.



- **Les mouvements cardio respiratoires.** Les mouvements respiratoires et les contractions cardiaques sont sources d'artéfacts lors de la collecte de données. Pour un examen du thorax, la contribution du patient est nécessaire. Ceci implique le maintien de la respiration durant un laps de temps assez court (20 secondes), soit en fin d'expiration ou en fin d'inspiration. L'état de remplissage des poumons joue un rôle important dans la qualité d'image. En fin d'expiration, l'hétérogénéité magnétique est réduite et la densité des protons dans un voxel est augmentée, permettant ainsi d'élever l'intensité du signal du tissu pulmonaire. Le maintien de la respiration n'est pas toujours évident, en particulier chez les personnes ayant une sévère atteinte pulmonaire ou encore pendant les études précliniques sur le rongeur.

Toutes ces conditions ont largement contribué à limiter l'accessibilité de cette modalité dans l'évaluation du parenchyme pulmonaire. A ce stade, bien évidemment l'IRM semble moins attrayante que l'imagerie par rayon X. Pourtant les nombreux avantages et les solutions proposées à ces lacunes, motivent de plus en plus à utiliser l'IRM comme alternative.

- Absence d'irradiation favorisant le suivi longitudinal plus ou moins à long terme sans risque pour les personnes sensibles aux radiations (enfants, femmes enceintes).
- Discrimination des différents tissus mous avec une résolution spatio-temporelle intéressante et une grande variété de contrastes.
- Développement de différents modes sophistiqués de recueil de données (remplissage cartésien, spiral, radial) donnant un contrôle sur la durée d'acquisition.
- Possibilité de synchronisation de l'acquisition d'image au cycle respiratoire.
- Acquisition d'images aussi bien anatomiques que fonctionnelles. L'IRM donne accès à la morphologie pulmonaire et renseigne sur la ventilation en utilisant des traceurs dédiés à cet effet.

L'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique a été prouvée dans l'étude de la ventilation. Elle s'appuie sur le maintien de la respiration suite à l'inhalation de gaz inertes. Une image est acquise et renseigne sur la distribution du gaz. Des études cliniques réalisées avec différents gaz – Dioxygène (Ohno et al., 2001), Fluor 19 (Halaweish et al., 2013), Hélium 3 (Saam et al., 2000) et Xénon 129 (Virgincar et al., 2013) – ont montré que des poumons sains présentent une répartition homogène du gaz inhalé, alors que ceux atteints d'une pathologie inflammatoire ont des zones pourvues d'un défaut de ventilation (figure 4). Ces défauts peuvent être dus à une obstruction des voies respiratoires (mucoviscidose), ou à une destruction du tissu alvéolaire (BPCO).



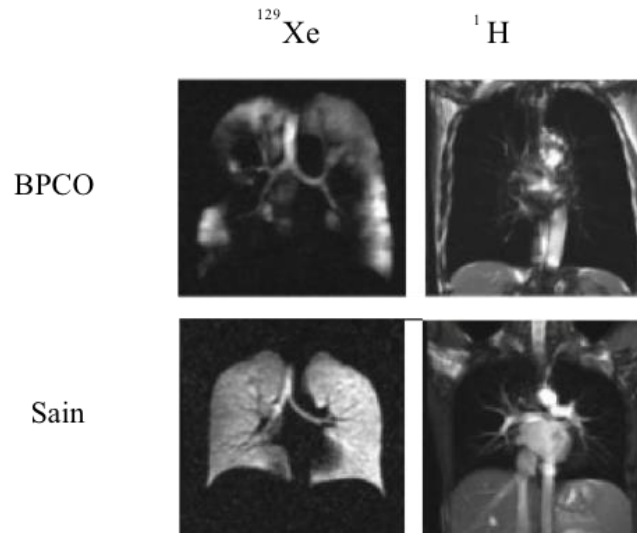


Figure 4 : Distribution du Xénon 129 dans les poumons d'un sujet atteint de BPCO et d'un sujet sain (Virginicar et al., 2013)

L'imagerie est généralement l'étape finale de l'établissement de diagnostic. Mais elle arrive bien souvent à un stade trop avancé de la maladie. Les changements phénotypiques sont déjà installés. Or, avant toute altération anatomique, une cascade d'évènements à l'échelle génotypique se succède.

Pour identifier précocement les maladies inflammatoires chez les personnes à risques (comme les fumeurs), une solution possible est d'utiliser les enzymes comme biomarqueur de l'inflammation. Dans ce contexte l'imagerie moléculaire 3D des protéases impliquées peut se révéler comme un moyen de choix.

### 1.3. Implication des protéases dans les maladies pulmonaires - Les protéases : une épée à double tranchant

La protéolyse est un mécanisme hautement régulé, ayant un rôle fondamental dans la plupart des processus physiologiques comme la coagulation, la cicatrisation, la digestion, la maturation et le recyclage cellulaires, l'inflammation et le remodelage tissulaire. La protéolyse est catalysée par des enzymes protéolytiques, aussi appelées protéinases, peptidases ou protéases (Rawlings, 2013). Elles proviennent essentiellement de cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophages et lymphocytes), de cellules épithéliales, de fibroblastes et de cellules endothéliales (Taggart et al., 2005). Elles catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques (figure 5) à l'intérieur ou aux extrémités d'un substrat spécifique (Law and Tung, 2009). L'hydrolyse peut également se réaliser de façon spontanée. Cette action conduit à l'activation, l'inactivation ou bien à la dégradation du produit nouvellement formé.

De ces nombreux processus assurés par les protéases, la dérégulation de ces derniers conduits à une perte de fonctionnalité et à l'inflammation. C'est la raison pour laquelle une importance particulière est accordée à l'activité protéolytique, aussi bien d'un point de vue fondamental que dans un but diagnostique ou thérapeutique.

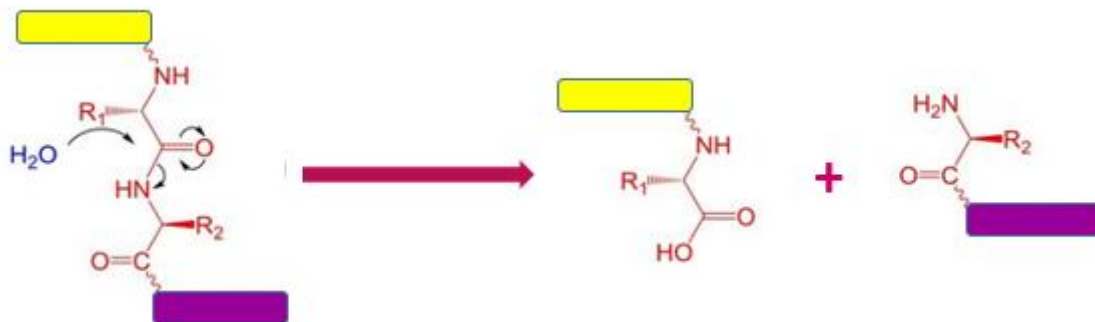


Figure 5 : Principe d'une réaction hydrolytique. L'hydrolyse de la liaison peptidique peut se faire soit spontanément ou sous l'action d'une enzyme protéolytique

#### 1.3.1. Famille d'enzymes

Chez le mammifère, 2 % du génome (Puente et al., 2005) coderait une panoplie de protéases, soit pas moins de 553 protéases chez l'homme et 628 chez de la souris (Puente et

al., 2003). Elles sont classées en différentes familles sur la base de leur site actif et leur mode d'action. Trois groupes majeurs (figure 6) se distinguent dans les maladies inflammatoires pulmonaires (Dey et al., 2018; Pandey et al., 2017).

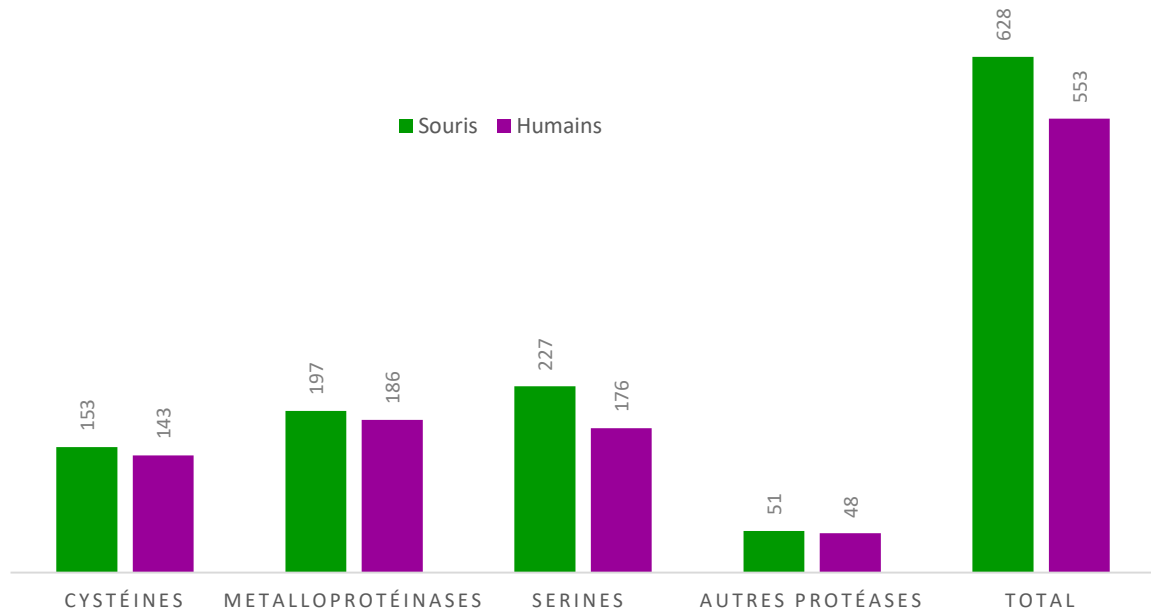


Figure 6 : Répartition des protéases chez l'homme (vert) et la souris (violet) (Puente et al., 2003)

### Les protéases à cystéines

Les protéases à cystéine procèdent entre autres à la digestion intracellulaire et aux contrôles du mécanisme de l'apoptose (Pandey et al., 2017). Leur capacité destructrice, conduit, dans les maladies inflammatoires pulmonaires, à l'accélération de la dégradation des fibres de collagène et d'élastine, et au développement d'emphysème.

Ces protéases sont bio-synthétisées sous forme de précurseur inactif appelés zymogènes (ou pro-enzymes) dont l'accès au site actif est bloqué par un peptide (Verma et al., 2016). Leur activation s'effectue par des clivages protéolytiques entre le peptide et le zymogène et nécessite parfois un réarrangement de conformation du site actif (Donepudi and Grütter, 2002).

Les caspases et les cathepsines sont deux groupes appartenant à la famille des protéases à cystéines.

- **Les Caspases** sont aux nombres de 11 chez les humains et sont connus pour être extrêmement spécifiques. Les substrats à cliver possèdent des résidus d'acide

aspartique. Ils jouent un rôle essentiel dans le processus apoptotique, qui n'est réalisé que par un nombre restreint de protéases (Dey et al., 2018) : les caspases 2,3,6,7,8,9,10. Les caspases 3 interviennent dans l'apoptose cellulaire des neutrophiles et une perturbation de cette cystéine protéase permettrait l'accumulation des cellules sur les sites inflammatoires.

- **Les Cathepsines** sont un groupe de 11 enzymes (Bühling et al., 2004; Verma et al., 2016). Contrairement aux caspases, les cathepsines ont une faible spécificité (Chwieralski et al., 2006). Ces enzymes ne peuvent dégrader que des protéines extracellulaires (Bühling et al., 2004; Wolters and Chapman, 2000) dans un environnement acide (Turk and Stoka, 2007).

#### *Les Métalloprotéinases (MMP)*

Les MMP sont caractérisées par la présence d'un atome de zinc (Owen and Campbell, 1995) dans leur site actif. Ce sont des enzymes produites principalement par les macrophages (Kheradmand et al., 2012) à l'exception de la collagénase MMP-8 et la gélatinase MMP-9, contenues dans les granules du neutrophile (Ratjen et al., 2002). Ces protéases sont libérées sous forme latente dans le milieu extra cellulaire. Une fois activées, les MMP orchestrent le renouvellement et la dégradation de la matrice extracellulaire, l'embryogenèse, l'angiogenèse et la cicatrisation.

L'implication des MMP dans ces diverses fonctions physiologiques, leur donne un rôle important dans les processus pathologiques. Les MMP dégradent essentiellement les macromolécules de la matrice extra cellulaire et les molécules impliquées dans l'adhésion intercellulaire. Ces modifications architecturales sont significatives dans le développement d'emphysème pulmonaire (D'Armiento et al., 1992; T Abboud and Vimalanathan, 2008), de maladies bulleuses de la peau (Kähäri and Saarialho-Kere, 1997) et causent des invasions tumorales et les métastases (Kleiner and Stetler-Stevenson, 1999).

#### *Les protéases à sérines*

Les protéases à sérines sont définies par un site catalytique constitué de 3 acides aminés : une sérine, une histidine et un acide aspartique. Cette famille comprend tout un arsenal d'enzymes : élastases, granzymes, kallikreine, matriptases, protéinases 3, cathepsines A et G, trypsines, thrombines et tryptases, (Bühling et al., 2004).

Dans la partie suivante, une attention particulière sera portée aux protéases à sérine issues des neutrophiles, en raison d'une importante part de responsabilité dans les pathologies inflammatoires.

### 1.3.2. Les protéases à sérines du neutrophile

Les neutrophiles sont des cellules immunitaires appartenant à la famille des leucocytes (globules blancs). Ils sont produits par la moelle osseuse et circulent librement dans les voies sanguines. Les cellules sont identifiables par leur noyau segmenté et un cytoplasme granuleux. Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées sur un site inflammatoire (Voynow et al., 2008). L'appel de ces cellules est porté par l'augmentation du taux de médiateurs pro-inflammatoires tels que des facteurs tumoraux de nécrose TNF- $\alpha$  (Turk and Stoka, 2007) et des interleukines (IL-1, IL-18, ...) (Dey et al., 2018; Lacy, 2006). Les neutrophiles migrent rapidement par chimiotactisme de la circulation sanguine au foyer inflammatoire avant de solliciter leurs granules cytoplasmiques. Ces granules sont un réservoir d'enzymes comprenant les protéases à sérines. Parmi ces protéases à sérines sont regroupés l'élastase du neutrophile (NE), la protéinase-3 (PR3) et la cathepsine G (CG).

Les protéases à sérines sont initialement synthétisées à l'état immature et nécessitent un clivage enzymatique d'une cathepsine C (ou dipeptidyl peptidase I) pour leur maturation (Crisford et al., 2018; McGuire et al., 1993). Les spécificités de NE et de PR3 sont très proches, puisqu'elles partagent une affinité pour des substrats possédant un résidu valine (Witko-Sarsat et al., 1999) alors que CG hydrolyse de préférence ceux ayant un résidu d'acides aminés aromatiques (Pham, 2006).

Ces protéases ont un rôle à double tranchant. D'une part à l'état physiologique, elles participent à la dégradation de tout corps étranger et hostile, et au maintien de l'homéostasie (Korkmaz et al., 2010). En plus, PR3 limite l'invasion du neutrophile en déclenchant son apoptose grâce à ses propriétés pro-apoptotiques qui activent la caspase-3 (Loison et al., 2014). Et d'autre part, en présence d'une inflammation incontrôlée, les protéases à sérine sont responsables de nombreux phénomènes associés à des pathologies (cancer, emphysème, mucoviscidose, ...). Elles affectent la clairance ciliaire en endommageant le tissu épithélial ciliaire des bronches (Korkmaz et al., 2010) et en incitant aussi les glandes muqueuses à produire davantage de mucus (Lundgren et al., 1994; Voynow et al., 1999; Witko-Sarsat et al., 1999). Dans une étude expérimentale chez le hamster, Kao a démontré que ces protéases à sérine sont capables de causer un emphysème (Kao et al., 1988). Elles s'impliquent indirectement dans l'altération des composants de la matrice extra cellulaire comme

l'élastine, le collagène, la fibronectine (Rao et al., 1991) par activation des MMP-2 et MMP-9 suite à la coupure de leur résidu peptidique (Gaggar et al., 2007; Shamamian et al., 2001).

En règle générale, la sécrétion et l'activité des protéinases sont finement contrôlées, par des inhibiteurs dont l'intégrité anatomique repose sur un équilibre protéases / anti protéases.

### 1.3.3. L'équilibre protéases / anti protéases

Les anti-protéases sont des composés moléculaires qui interagissent au site catalytique d'une protéase dans le but de l'inhiber. A l'état physiologique, un état stationnaire entre l'activité et l'inhibition est établi entre les deux protagonistes afin que les enzymes puissent être actives sans devenir délétères. Toutefois, en situation pathologique une dérégulation de cette homéostasie protéolytique peut être observée.

Les inhibiteurs pulmonaires majeur des protéases à sérines sont les anti-leucoprotéases (également appelé SLPI pour *secretory leukoprotease inhibitor*), l'alpha-1-antitrypsine (A1AT) et l'elafin (Wiedow et al., 1991) plus spécifique à la protéinase-3.

La principale composante du schéma de régulation anti-protéases à sérines dans le poumon humain est A1AT. C'est une protéine appartenant à la famille des serpinines (*serine protease inhibitors*). Elle est bio-synthétisée par les cellules du foie (hépatocytes), bien que les neutrophiles (Pääkkö et al., 1996) et les cellules bronchiques (Cichy et al., 1997) soient capables de l'exprimer à un taux moindre. Son objectif premier est de protéger le poumon (Dey et al., 2018). Pour cela, A1AT exerce une inhibition irréversible sur l'activité protéolytique des protéases à sérines du neutrophile (Pandey et al., 2017; Petrache et al., 2006). En réponse à une inflammation ou à une infection, des médiateurs pro-inflammatoires induisent une dérégulation et une surexpression de protéases (Bergin et al., 1991) menant à une carence en inhibiteur. Ce déséquilibre est souvent associé aux pathologies inflammatoires. Birrer et ses collaborateurs ont prouvé, après analyse de fluides épithéliaux de patients atteints de mucoviscidose, que la majorité des inhibiteurs était inopérant (Birrer et al., 1994).

L'inefficacité des anti-protéases à assumer leurs rôles, s'explique par un excès d'enzyme. Deux causes possibles peuvent être à l'origine de cette défaillance.

- **Inactivation des inhibiteurs.** Une étude comparative menée par Gadek (Gadek et al., 1979) sur des LBAs issus de groupes de fumeurs et de non-fumeurs, a montré

l'effet du tabagisme sur l'A1AT. La fumée de cigarette réduit l'activité fonctionnelle de l'inhibiteur et conduit à un appel de neutrophiles.

De plus, les enzymes NE et MMP-9 favorisent le maintien du déséquilibre. Elles désactivent respectivement les inhibiteurs de MMPs (TIMPs) (Jackson et al., 2010), et A1AT (Liu et al., 2000).

- **Déficience génétique d'A1AT.** C'est une maladie génétique héréditaire. Le gène responsable de cette déficience est *SERPINA1*, localisé sur le chromosome 14. Une mutation sévère et ponctuelle, appelée Z, consiste en une substitution d'un acide aminé glutamate par une lysine (Gooptu et al., 2009). Cette mutation bloque la sécrétion d'A1AT nouvellement synthétisée, créant une carence en inhibiteur. Par conséquence les risques de BPCO et de sévère maladie hépatique sont accrus (Perlmutter et al., 2007).

L'équilibre protéases / anti-protéases est impliquée de façon complexe dans la progression de l'inflammation. La protéolyse joue un rôle critique dans les conditions physiologiques normales et pathologiques ce qui en fait un biomarqueur prometteur pour l'étude précoce de maladies inflammatoires par imagerie moléculaire.

## 1.4. Imagerie moléculaire de la protéolyse

Les connaissances concernant les événements moléculaires en fonctionnement normal et altéré sont en perpétuelles évolutions. En même temps, les connaissances biologiques, les avancées dans l'instrumentation et l'électronique médicale combinée à la créativité des chimistes ont rapidement mené à l'expansion du champ de l'imagerie moléculaire.

L'imagerie moléculaire est un concept familier étendu à un large spectre d'applications regroupant l'IRM, l'imagerie optique et la médecine nucléaire. Cette discipline associe la biologie cellulaire, moléculaire et l'imagerie diagnostique.

Elle est la cartographie spatiale et temporelle d'un composant ou de processus chimiques et biologiques (Weissleder and Mahmood, 2001) *in vivo*. Elle met en relief des biomarqueurs révélateurs d'une activité cellulaire ou de l'expression d'un gène altéré. Ainsi, le fort potentiel de l'imagerie moléculaire offre la voie au diagnostic précoce, et au suivi thérapeutique. De plus, chaque individu étant unique, cela semble aussi, être un bon moyen de personnaliser un traitement pour augmenter ses chances d'efficacité.

L'imagerie moléculaire repose essentiellement sur l'utilisation de sondes pharmaceutiques. Leur synthèse est spécifique à la modalité d'imagerie et à l'enjeu biomédical. Quelle que soit la technique de détection, les sondes utilisées répondent aux mêmes exigences. Elles sont composées d'un vecteur (anticorps, protéine, lipide ou glucide) marqué à un agent d'imagerie moléculaire (radionucléide, agent fluorescent ...) détectable par des capteurs externes. Suite à l'injection de la sonde, le vecteur se dirige vers sa cible (un gène ou un processus biologique) et par accumulation ou par activation, l'agent détectable émet un signal suffisant pour être perçu en imagerie. Sur les images recueillies, chaque zone de contraste apporte des renseignements sur la localisation et aide à la quantification de l'élément cible.

En quelque sorte, l'imagerie moléculaire est une forme alternative et non invasive d'examen histo-pathologique *in vivo*, où l'agent de contraste est comparable à un colorant et la modalité d'imagerie équivaut au microscope. L'imagerie moléculaire de l'activité de la protéase constituerait une stratégie puissante pour aborder en temps réel et de manière fiable les processus biochimiques qui découlent de maladie inflammatoire.



### 1.4.1. Imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire est un champ d'exploration des mécanismes patho-physiologiques avec une très forte sensibilité de détection, chez l'homme et l'animal. Dans cette catégorie, on s'intéressera à la tomographie par émission de positon (TEP) et la tomographie par émission mono photonique (TEMP).

La TEP est une modalité quantitative d'imagerie dont le principe repose sur un traceur moléculaire radioactif. Le radio-isotope ( $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  et  $^{18}\text{F}$ ) se dégrade au cours du temps par l'émission de positron. Quand un positron interagit avec un électron voisin, les deux particules s'annihilent et émettent deux photons gamma dans des directions diamétralement opposées. Ces photons tracent une ligne de coïncidence permettant la localisation du point de désintégration, par des détecteurs.

La TEMP se distingue de la TEP, par une désintégration par émission d'électron (ou particule  $\beta$ ). Le radionucléide ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$  et  $^{111}\text{In}$ ), par interaction avec un électron génère un photon gamma. Ce photon est détectable par des gammas caméras en rotation autour du patient.

Afin d'illustrer le concept d'imagerie moléculaire TEP, Shen a conduit une étude pour localiser des zones tumorales. Pour cela, avec son équipe, ils ont synthétisé un substrat marqué au  $^{18}\text{F}$ , qui suite à l'hydrolyse d'une caspase 3, change de conformation. L'agent de contraste subit une cyclisation intramoléculaire et une agrégation permettant une rétention de l'activité du  $^{18}\text{F}$  dans les tumeurs apoptotiques (Shen et al., 2013).

D'autres agents de contraste ont été élaborées, mais cette fois pour aborder la question thérapeutique. Ils ont été développés à partir d'inhibiteurs ou d'anticorps, pour à la fois localiser des protéases améliorant le contraste de l'image et inhiber leur activité.

Golestani a proposé une sonde TEMP marqué au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ayant une grande affinité inhibitrice pour les MMP-12/13 chez des souris transgéniques et sujettes au développement de maladie inflammatoire pulmonaire (Golestani et al., 2017). De son côté, Kondo s'est intéressé à un radio traceur  $^{18}\text{F}$ -IPFP dont le vecteur était basé sur la structure d'un inhibiteur MMP. Les tests *in vitro* menés, ont montré une forte spécificité du ligand pour les MMP2/9/12/13. Ainsi, *in vivo*, 50 minutes après injection du radio-traceur, la cartographie a montré une accumulation importante de radioactivité dans les poumons et le cœur de modèles de souris BPCO. Le signal était deux à dix fois plus élevé que chez les souris saines.

Les reconstructions tomographiques 3D, en imagerie nucléaire, sont restreintes à ne fournir des informations précieuses que sur la bio distribution des traceurs. Pour réaliser de l'imagerie de l'activité protéolytique, il est plus intéressant de travailler sur des modalités

qui permettent de visualiser un changement significatif du signal émis par l'agent d'imagerie après intervention d'une protéase.

### 1.4.2. Imagerie optique

La caractéristique non ionisante de l'imagerie optique est un avantage important par rapport à l'imagerie nucléaire. C'est notamment un excellent candidat à l'imagerie de la protéolyse. L'agent de contraste est une molécule fluorescente liée de façon covalente à une structure peptidique. Dans leur forme native, les sondes sont optiquement silencieuses. Sur le site de leur cible, le marqueur fluorescent est libéré de la macromolécule par hydrolyse enzymatique, permettant sa détection avec un fort rehaussement de signal. Une série d'agents d'imagerie a été conçu pour refléter la surexpression de l'activité d'une enzyme spécifique. Ces sources de contraste reposent le plus couramment sur la fluorescence dans le proche infrarouge et la bioluminescence.

#### *Fluorescence dans le proche infrarouge (NIRF)*

C'est la technique la plus courante pour l'imagerie *in vivo* de l'activité des protéases. L'utilisation de sondes optiques émettant une fluorescence entre 700 et 900 nm permet d'optimiser la pénétration tissulaire des photons et de minimiser les effets d'auto-fluorescence des tissus physiologiques (Dimastromatteo et al., 2018) .

L'imagerie NIRF doit faire appel à une source de lumière extérieure à l'organisme pour révéler l'agent moléculaire optique. Le matériel nécessaire au recueil des données de fluorescence est simple et consiste en une source d'excitation et un détecteur sensible doté des filtres adéquats pour capter les signaux de fluorescence. Cette source excite chaque étiquette NIRF afin de générer une représentation visuelle de la distribution spatio-temporelle des marqueurs fluorescents dans les tissus biologiques.

La première imagerie *in vivo* de l'activité protéolytique a été démontrée par Weissleder en 1999, sur un modèle de carcinome xénogreffe dans un poumon de souris. La sonde NIRF était liée à un long polymère constitué de poly-L-lysine (PL) et de méthoxypolyéthylène glycol succinate (MPEG). Au bout de 24h après injection de la sonde, le signal NIRF a été révélé par clivage protéolytique, libérant ainsi la sonde fluorescente de PL-MPEG. L'imagerie *in vivo* a montré un signal multiplié par 12 (figure 7), permettant une détection fine de la tumeur dont le diamètre était inférieur à 300  $\mu\text{m}$ . Mais cette stratégie proposée lors

de cette étude n'était pas spécifique à une enzyme. La sonde optique pouvait être activée par des protéases à sérines et à cystéines (Weissleder et al., 1999).

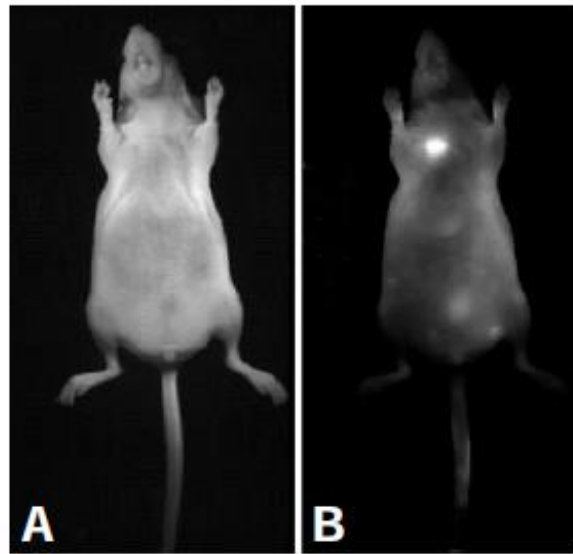


Figure 7 : Imagerie NIRF d'une tumeur microscopique. (Weissleder et al., 1999).

- A) Aucun signal fluorescent n'a été détecté chez le contrôle sain
- B) La fluorescence NIRF a facilement été détectée dans la poitrine 24 h après l'implantation de la tumeur.

Les résultats de cette recherche ont dynamisé la course au développement de sonde NIRF spécifique à une enzyme protéolytique. En effet, l'activité de diverses protéases a fait l'objet d'études *in vivo* : le MMP-13 (Yhee et al., 2012), la cathepsine B (Kircher et al., 2004; Withana et al., 2016), le NE (Kossodo et al., 2011).

### *Bioluminescence (BLI)*

L'imagerie par bioluminescence fait référence à la lumière produite par la réaction enzymatique entre une enzyme, la luciférase, avec son substrat, la luciférine. La lumière émise à l'issue de la réaction est détectable par une caméra à dispositif de charge. Ce système détecte les photons, puis les convertit en électrons afin de fournir une image reconstruite en deux dimensions.

Dans cet exemple d'application, Xia et ses collègues, ont développé une sonde bioluminescente pour la détection *in vivo* de l'activité des protéases MMP-2 et MMP-9 (Xia et al., 2011). Ils ont conçu une macromolécule constituée de la protéine luciférase fusionnée à une protéine (CNA35) se fixant au collagène. CNA35 maintient la luciférase dans le microenvironnement extracellulaire pour une détection efficace des MMP. Cette

macromolécule a ensuite été conjuguée avec un peptide dabcy1 qui inhibe l'activité de la luciférase. Les métalloprotéinases catalysent l'hydrolyse de la liaison entre le peptide dabcy1 et la macromolécule, et rendent actif la luciférase. Ainsi, après injection de la luciférine, ici le coelenterazine, l'activité des protéases MMP-2 et MMP-9 *in vivo* est révélée par l'activité des luciférases chez des souris ayant subi une xéno greffe de tumeur.

Malgré ses avantages, l'imagerie optique semble néanmoins limitée au contexte préclinique nécessitant l'expérimentation sur le petit animal. Son pouvoir de pénétration au travers les tissus est très limité (Kashefi et al., 2011). Les photons ne sont pas détectés dans les tissus profonds. De plus, ce type d'approche nécessite parfois des manipulations génétiques (Miller et al., 2004; Weissleder and Mahmood, 2001). Par exemple, la luciférase n'est pas exprimée chez le mammifère et sa détection implique l'utilisation de cellules génétiquement modifiées.

### 1.4.3. IRM moléculaire

Par comparaison avec les imageries nucléaire et optique, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique bien moins invasive qui offre une résolution spatiale correcte et une pénétration très élevée dans le tissu. Cette modalité est très compétitive, elle a la capacité de fournir conjointement des informations anatomiques, fonctionnelles et métaboliques. En revanche elle souffre d'un manque intrinsèque de sensibilité de détection du signal et également de spécificité à révéler des processus déterminés.

#### *Les agents de contraste T1 / T2*

Ces agents de contraste modulent le signal IRM en augmentant la vitesse de relaxation magnétique des protons dans les tissus environnants. Cela a pour effet de réduire les temps de relaxation longitudinal (T1) et / ou transversal (T2 et T2\*) du tissu cible. Deux types d'agents se distinguent selon leur propriété magnétique (Xiao et al., 2016).

Les agents de contraste paramagnétiques contiennent des ions métalliques qui sont généralement le dysprosium (Dy<sup>3+</sup>), le gadolinium (Gd<sup>3+</sup>) ou le manganèse, (Mn<sup>2+</sup>). La présence d'électrons non appariés confère à ces agents de contraste des propriétés paramagnétiques : le gadolinium possède 7 électrons non appariés, le dysprosium en a 4 et le manganèse 5.

L'ion gadolinium (III) est le plus couramment utilisé, compte tenu de son moment magnétique élevé et de sa stabilité sous forme chélatée. Les agents de contraste contenant

cet ion, raccourcissent les temps T1 et T2 des protons d'eau voisins. La baisse du T1 se produit à des concentrations plus faibles en gadolinium, tandis que la réduction du T2 se produit à de plus fortes concentrations. Pour diminuer les risques de toxicité les images obtenues en clinique sont toujours pondérées T1.

Les agents super paramagnétiques sont constitués de nanoparticules d'oxyde de fer (III). Ces nanoparticules peuvent avoir des dimensions différentes qui influenceront sur leur bio-distribution dans l'organisme. Parmi cette famille, se trouvent les MPIO (de 300nm à 3.5µm), les SPIOs (60 à 180nm) et les USPIOs (de taille inférieure à 50nm). Tout comme l'ion  $Mn^{2+}$ , ces nanoparticules affectent fortement la relaxation T2.

Un certain nombre de sondes IRM, contenant du gadolinium ou des particules d'oxydes de fer, activables par des enzymes a été développé en tirant parti de l'activité catalytique. La réaction hydrolytique d'une protéinase cible occasionne un changement de configuration intramoléculaire de la sonde IRM. Ce mécanisme de conversion chimique permet de moduler le contraste T1 ou T2.

Ye a utilisé cette approche pour le suivi de tumeur apoptotique chez des souris vivantes. Des sondes à base de Gd-DOTA et sensibles aux caspases-3/7 ont été utilisées. La protéolyse a induit une cyclisation, puis la formation d'un agrégat de nanoparticules de Gadolinium, notée GdNPS (Ye et al., 2014). Le mécanisme d'activation de l'agent de contraste par les caspases est représenté par la figure 8. Sous forme agrégée, le signal IRM est suffisant pour être détecté et prouver l'activité enzymatique.

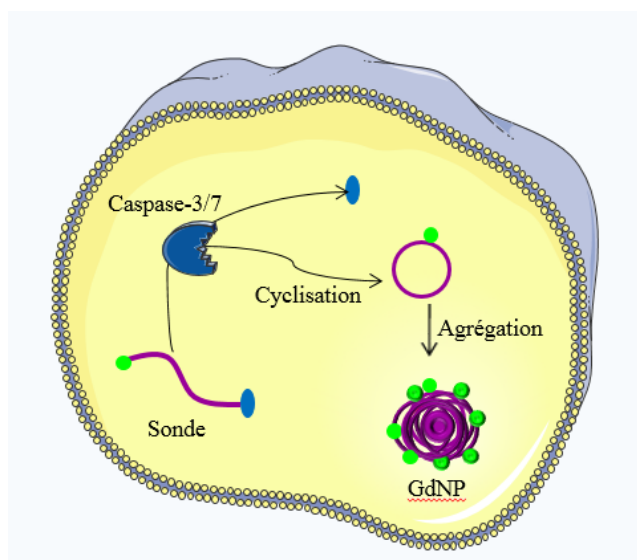


Figure 8 : Mécanisme de formation de la macromolécule GdNP pour la cartographie de l'activité des caspase-3/7. La sonde pénètre dans la cellule tumorale, où l'intervention des caspases-3 et 7 initie la cyclisation et la formation de GdNP.

Avec cette même stratégie, Gallo a présenté une sonde constituée de nanoparticules d'oxyde de fer. Les biomarqueurs MMPs-2/9 permettent l'agrégation de ces nanoparticules dans l'environnement tumoral. La réduction du temps T2 de 14% confirme d'une activité protéolytique dans la tumeur. (Gallo et al., 2014).

### *Fluor 19*

Contrairement aux protons très fortement présents dans l'organisme, le fluor 19 est quasi absent, à l'exception des os, des dents et des tissus calcifiés. Les noyaux fluorés possèdent une haute sensibilité et stabilité *in vivo*, ce qui est favorable pour des études de processus moléculaires.

La création de l'image est possible grâce à une antenne qui n'excite directement que les noyaux fluorés présents sur l'agent de contraste. Pour une sensibilité suffisante, les molécules sont basées sur des structures (polymères, micelles, nanoparticules) pouvant maximiser le nombre d'atomes. Cette imagerie apportant des informations moléculaires spécifiques est complémentaire à l'imagerie anatomique du proton. Ainsi une superposition des images du  $^{19}\text{F}$  et anatomique, renseigne de la localisation des objets d'intérêts.

Des sondes à base de  $^{19}\text{F}$  ont été conçues récemment pour détecter l'activité enzymatique de caspases-1 (Akazawa et al., 2018a), de caspases-3/7 (Akazawa et al., 2018b) et de MMPs 2/9 (Faas et al., 2019). Ces agents de contraste étaient représentés par une séquence peptidique auquel un chélate de  $\text{Gd}^{3+}$  et une nanoparticule comportant du  $^{19}\text{F}$  ont été greffés à chaque extrémité. De la même façon que le gadolinium raccourcit les temps T1 et T2 du proton, il a cette même tendance avec le fluor. Sous sa forme intacte, le signal du fluor est « éteint » à cause de sa proximité permanente avec le gadolinium. En présence de l'enzyme d'intérêt, la liaison est clivée, et le signal du fluor augmente avec la distance entre ce dernier et le chélate de  $\text{Gd}^{3+}$ .

### *Imagerie Transfert de Saturation par Echange Chimique (CEST)*

L'IRM CEST pour *Chemical Exchange Saturation Transfer* est une technique supplémentaire pour améliorer la sensibilité de base de l'IRM. Le principe de cette méthode est représenté par la figure 9. CEST débute par une saturation sélective de l'aimantation des protons de l'agent suivi d'échange chimique avec les protons de l'eau environnante. Cette

approche s'accompagne d'une diminution de l'aimantation des protons de l'eau de l'organisme.

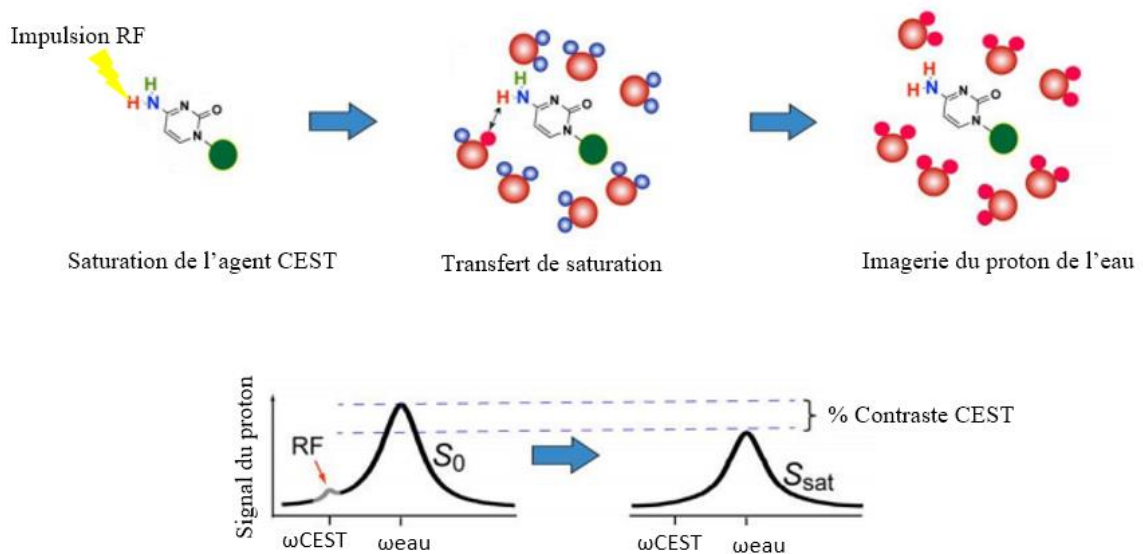


Figure 9 : Description du protocole d'imagerie CEST. Une saturation sélective à la fréquence de résonance des protons de l'agent CEST permet le transfert de saturation de ces derniers vers les protons voisins issus de l'eau. Une imagerie du proton de l'eau montre une perte de signal.

L'efficacité de l'agent à modifier le contraste de l'image est mesurée en pourcentage de transfert de saturation. Ce taux d'échange chimique peut être modifié après une catalyse enzymatique – cette méthode est connue sous le nom de catalyCEST. Des agents de contraste pour catalyCEST ont été développés pour étudier l'activité de l'urokinase plasminogène (Yoo et al., 2014), caspase-3 (Yoo and Pagel, 2006), cathepsine B (Hingorani et al., 2016) et kallikreine (Sinharay et al., 2018). Sinharay a détecté l'activité d'une protéase à serine, la kallikrein, avec un taux CEST de 5.5 % dans des tumeurs de souris.

L'imagerie CEST réside dans la possibilité d'obtenir une image de contraste en choisissant d'appliquer l'impulsion de saturation ou non. De ce fait, il est possible d'injecter plusieurs agents CEST et de suivre un processus par rapport à un autre en fonction de la fréquence de résonance de l'agent CEST choisi.

### *Hyperpolarisation – Polarisation dynamique*

Cette section concerne un domaine de recherche en pleine expansion et dont les applications en IRM ne concernent pas seulement la détection d'activités enzymatiques. La très faible sensibilité de la RMN peut être palliée par une augmentation de la polarisation de



spin dont le cas extrême est l'hyperpolarisation. L'hyperpolarisation consiste à accentuer la polarisation nucléaire de plusieurs ordres de grandeur. Le signal de résonance magnétique augmente ainsi de façon considérable, et rend possible les applications d'imagerie moléculaire.

Différentes stratégies d'hyperpolarisation sont possibles et sont présentées ci-dessous.

### Hyperpolarisation de gaz rares

Les noyaux de gaz rares comme l'Hélium 3 ou le Xénon 129 peuvent être hyperpolarisés grâce à l'utilisation du pompage optique de niveaux d'énergie électroniques. On citera la méthode MEOP (pour Metastable Exchange Optical Pumping) et SEOP (Spin Exchange Optical Pumping)

Dans le premier cas les l'Hélium-3 gazeux à basse pression est placé dans une faible induction magnétique. Les états électroniques supérieurs sont peuplés à l'aide d'une décharge radiofréquence (RF) pour peupler l'état 3S1 à partir de l'état 3P. Celui-ci est repompé grâce à de la lumière polarisée circulaire à 1083 nm. L'enrichissement à terme de l'état 3S1 conduit à l'enrichissement recherché de la polarisation nucléaire de l'état 1S0 par couplage direct entre l'électron et le noyau de l'Hélium qui se retrouve ainsi hyperpolarisé. (Colegrove et al., 1963).

L'hyperpolarisation de gaz rares peut-être également réalisée selon la méthode SEOP. Ce concept, décrit par Walker (Walker and Happer, 1997), est utilisée pour l'hyperpolarisation du  $^{129}\text{Xe}$  et  $^3\text{He}$ . Dans ce cas, l'état 1S1/2 (spin -1/2) du rubidium (Rb) présent dans la cellule à l'état gazeux et en contact avec le gaz rare est peuplé par pompage optique vers l'état 2P1/2 (spin +1/2) avec une lumière polarisée circulaire à 795 nm en présence d'un champ magnétique. Par contact de Fermi (collisions) avec les atomes de Xénon ou d'Hélium, la polarisation est transférée de l'électron du Rb vers le noyau du gaz rare qui devient ainsi hyperpolarisé.

Dans leur état hyperpolarisé,  $^{129}\text{Xe}$  et  $^3\text{He}$  ont largement contribué à l'étude de la ventilation. Depuis peu, une technique hyperCEST se développe en imagerie moléculaire. Elle combine la méthode CEST et l'hyperpolarisation de gaz rare (figure 10). La base de hyperCEST est une cage moléculaire, CB6, qui encapsule de manière réversible un atome de  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé. La diffusion du xenon au travers la cage moléculaire entraîne un déplacement de fréquence RMN. Pour l'imagerie, la séquence d'acquisition débute par une pré-impulsion de saturation à la fréquence du Xe encapsulé. Cette impulsion entraîne



uniquement la dépolarisation du  $^{129}\text{Xe}$  encapsulé qui sort de CB6 et est remplacé par un atome  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé. La sortie de Xe dépolarisé dans le réservoir de  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé diminue le signal.

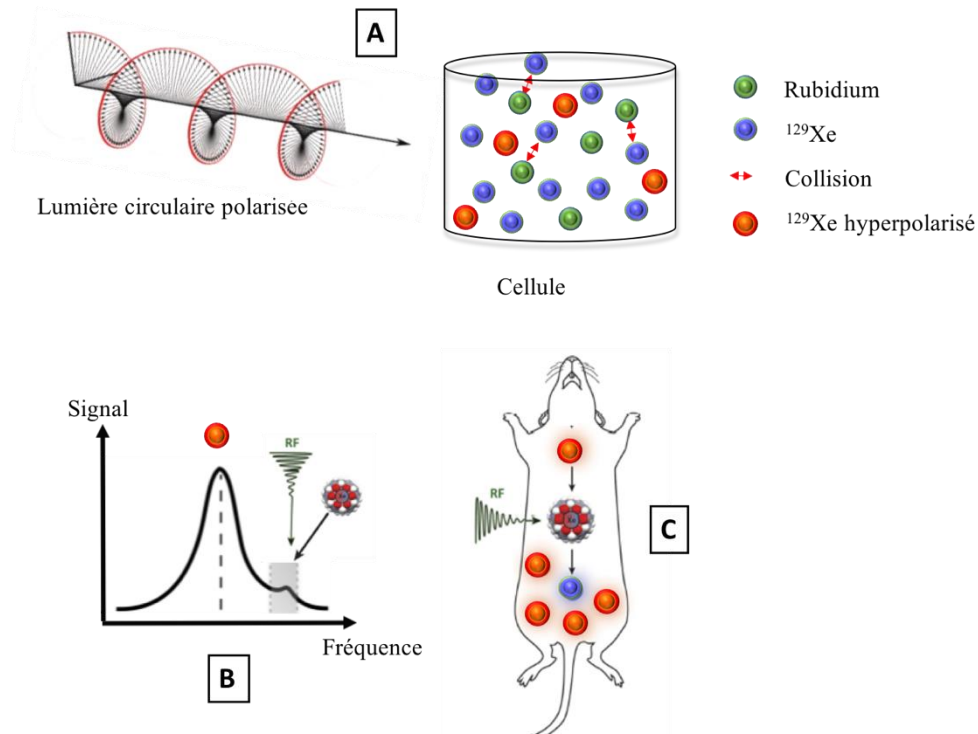


Figure 10 : (A) Polarisation du Xenon par pompage optique à échange de spin. Une cellule contenant du rubidium à l'état gazeux est excitée par un laser. Les collisions Xe et Rb résulte d'un échange de spin. (B) Au cours de l'acquisition, une saturation sélective est appliquée au décalage chimique de Xe-CB6. Lorsque le xénon dépolarisé sort de la cage CB6 pour laisser sa place à un Xe polarisé, il réduit le taux d'atomes Xe polarisés (détectables). (C). Une impulsion de saturation HyperCEST est appliquée à la fréquence du complexe Xe-CB6, dépolarisant le Xe en cage. Inspirée de (Hane et al., 2017)

En 2017, une mise en pratique *in vivo* de cette technique a été réalisé par Hane (Hane et al., 2017). La comparaison des images obtenues avec et sans pré impulsion à la fréquence de résonance du Xenon hyperpolarisé montre une réduction du signal IRM et renseigne de la présence de CB6.

En parallèle à cette étude, Slack a évalué l'activité biologique d'une protéase *in vitro*. Dans son article, un rotaxane contenant un substrat spécifique à MMP-2 a été ajouté à la structure CB6 (C. Slack et al., 2017). Le rotaxane ne permet pas le signal hyperCEST tant que sa liaison avec CB6 n'est pas rompue, car le  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé n'a pas d'accès au CB6. Le clivage du rotaxane par la protéase libère le CB6, active la réponse hyperCEST et révèle l'activité MMP-2. L'évolution du signal obtenue en spectroscopie est représentée par la figure 11.

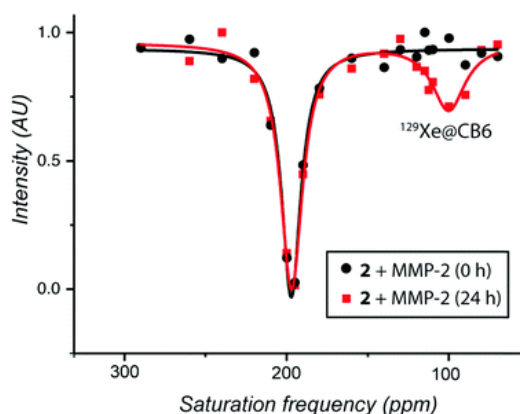


Figure 11 : Spectres hyperCEST du  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé en présence de CB6-rotaxane et de MMP2. En noir signal du  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé juste à  $t=0\text{h}$ . En rouge, le signal du  $^{129}\text{Xe}$ -CB6 à 100 ppm apparaît au bout de 24h, révélateur de l'activité de MMP-2. (C. Slack et al., 2017)

### Polarisation induite par parahydrogène (PHIP)

Le principe de PHIP a été présenté dans un article de Bowers (Bowers and Weitekamp, 1986). La molécule gazeuse dihydrogène,  $\text{H}_2$ , est constituée de deux atomes d'hydrogènes liés par une liaison covalente. Cette molécule existe sous forme de deux isomères, ortho et para. Les configurations des isomères se différencient par l'orientation des spins des noyaux d'hydrogène. Pour ortho, les spins ne sont pas anti-parallèles et pour para, les spins ont une orientation exactement contraire l'un par rapport à l'autre. Les isomères para sont dans un état singulet (de spin nucléaire total  $I=0$ ) et ne permettent pas d'obtenir de signal RMN.

A température ambiante, la répartition des isomères est de 25% de parahydrogène (pH<sub>2</sub>) et 75% d'orthohydrogène. La conversion ortho à para peut être effectuée à de faibles températures en présence d'un catalyseur paramagnétique (Natterer and Bargon, 1997). En effet, à 77K, le taux de pH<sub>2</sub> augmente jusqu'à 52% (Jonischkeit and Woelk, 2004). L'étape suivante dans l'hyperpolarisation PHIP est l'hydrogénation (figure 12). C'est un processus d'addition à une molécule organique (alcène) permettant de rompre la symétrie moléculaire du pH<sub>2</sub>, rendant ces protons hyperpolarisés.

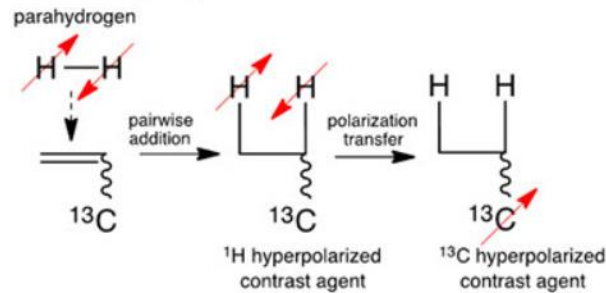


Figure 12 : Principe de la polarisation induite par parahydrogène. Le dihydrogène sous sa forme para, est additionné à une molécule marquée au  $^{13}\text{C}$ , afin casser sa symétrie moléculaire et permettre le transfert de polarisation. (Sigma-Aldrich)

Le couplage scalaire entre ces protons et d'autres noyaux comme le  $^{13}\text{C}$  ou le  $^{15}\text{N}$  de la molécule à hyperpolariser permet le transfert de polarisation.

### Polarisation dynamique nucléaire (PDN) à l'état solide

La Polarisation Dynamique Nucléaire est le transfert de polarisation de spin d'électrons non-appariés vers un noyau.

Le transfert de polarisation s'effectue à l'état solide à basse température, suivi d'une dissolution rapide de l'échantillon hyperpolarisé (Ardenkjær-Larsen et al., 2003). Pour que le processus soit effectif, une solution, composée d'un substrat (en général marqué au  $^{13}\text{C}$ ) et d'un radical (nitroxyde ou trityle) est préparé. Dans le système PDN, l'échantillon est soumis à un champ magnétique de 3,3T environ et refroidi à 1,2K. A une telle température, la polarisation du spin électronique du radical est proche de 1. Une irradiation par des micro-ondes à la fréquence de résonance des spins électroniques (94GHz) engendre le transfert de polarisation du radical au spin nucléaire du substrat. L'échantillon est par la suite dissout et rapidement étudié pendant les expériences RMN. En effet, sous forme dissoute, l'hyperpolarisation nucléaire disparaît en quelques minutes sous l'effet de la relaxation longitudinale.

La procédure d'hyperpolarisation du  $^{13}\text{C}$  (PHIP ou PDN à l'état solide), ont fait l'objet d'étude métabolique. Le  $[1-^{13}\text{C}]$ -pyruvate est le plus récurrent dans la littérature. C'est un traceur du métabolisme cellulaire car il conduit à la formation de  $[1-^{13}\text{C}]$ -lactate, en condition anaérobie, sous l'action du catalyseur lactate déshydrogénase. Cavallari et ses collègues ont exploité cette conversion pour la cartographie in vivo du pyruvate et pour l'analyse du métabolisme de formation du lactate dans le cœur (Cavallari et al., 2018). Ils ont injecté par voie intra veineuse du  $[1-^{13}\text{C}]$ -pyruvate hyperpolarisé chez des souris saines et des souris présentant une cardiomyopathie. Les images du  $^{13}\text{C}$  à la fréquence de résonance

du pyruvate et du lactate, ont mis en évidence une diminution du signal du lactate, signe d'un dysfonctionnement métabolique survenant dans le muscle cardiaque des souris pathologiques.

### Polarisation dynamique nucléaire par effet Overhauser

Brièvement, le fondement réside dans la saturation en RPE (Résonance Paramagnétique de l'électron) des états de spin d'un radical libre en solution par une irradiation micro-onde. La polarisation d'un électron est approximativement 660 fois plus élevée que celle du proton. En milieu aqueux, les interactions (essentiellement dipolaires) entre les spins des protons de l'eau et ceux des électrons, permettront le transfert de polarisation électron-proton. L'encodage spatial qui s'en suit immédiatement, s'accompagne d'une nette amélioration du signal IRM. On ne pourra cependant pas parler d'hyperpolarisation, car les facteurs de rehaussement sont en général très inférieurs à 10000. Les aspects théoriques de l'effet Overhauser sont traités dans le Chapitre 2.

### **Mesures de pH**

Les mesures de pH *in vivo* sont des outils considérables en clinique. Le pH détient un rôle critique en conditions physiologiques et pathologiques. La rupture de l'équilibre du pH physiologique s'inclut dans les phénomènes liés à l'ischémie du myocarde, l'inflammation, l'ulcération gastrique (Khramtsov, 2005), la mucoviscidose (May et al., 1991) et les tumeurs (Raghunand and Gillies, 2000). En outre, la délivrance, l'absorption et l'efficacité pharmacologique d'un médicament peuvent être compromises par ce changement local de pH.

La cartographie du pH utilise des nitroxydes en tant que pH-mètre moléculaire (Efimova et al., 2011; Khramtsov et al., 2010). Les nitroxydes dérivées de l'imidazoline et de l'imidazolidine et les radicaux trityl (Bobko et al., 2007; Dhimitruka et al., 2013; Marchand et al., 2016) ont prouvé leur fort potentiel dans les milieux acides, comme les environnements tumoraux (Bobko et al., 2012; Samouilov et al., 2014) et l'estomac (Foster et al., 2003).

Les cartographies de pH sont rendues possibles par un décalage du spectre qui survient lors de la protonation du radical (figure 13). Une légère variation de la constante de couplage hyperfine de l'azote ( $a_N$ ) d'environ 1G (Efimova et al., 2011) a été observée.

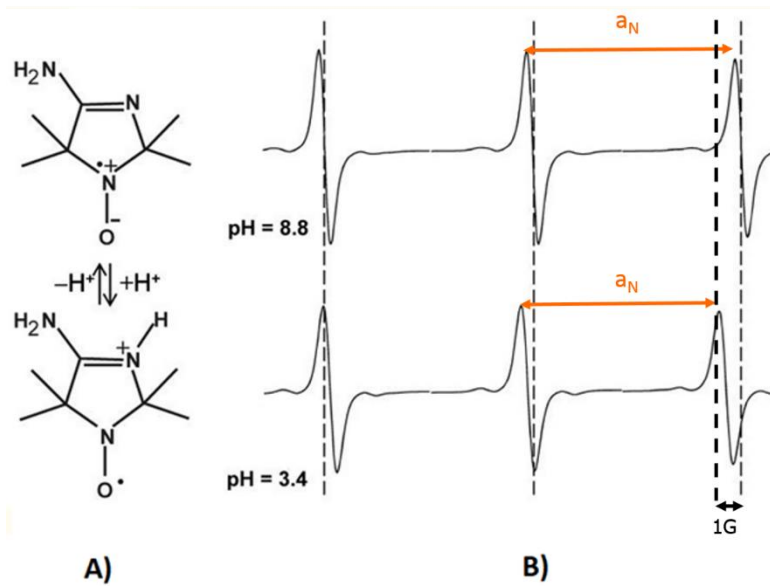


Figure 13 : Protonation d'un radical sensible au pH (Efimova et al., 2011)

A) Réaction réversible de la protonation de l'imidazoline

B) Spectre correspondant à la réaction. Les lignes en pointillées indiquent un décalage en fréquence de 1G

## Oxymétrie

La concentration en oxygène  $O_2$  d'un tissu est le paramètre principal pour décrire la viabilité d'un organe. L' $O_2$  est transporté par les globules rouges et délivré en fonction des besoins métaboliques et l'état fonctionnel de chaque organe. En condition pathologique (cancer, maladie cardiaque, AVC), l'oxygénation est sévèrement limitée. Ces maladies sont associées à une diminution locale de la pression partielle en oxygène ( $pO_2$ ). Dans le domaine de l'oncologie, une carence en  $O_2$  augmente la résistance des cancers face aux traitements (radiothérapie, chimiothérapie) et favorise également les métastases et la progression maligne des tumeurs.

La mesure *in vivo* de  $pO_2$  par la PDN par effet Overhauser a été démontrée dans des échantillons aqueux et des tissus biologiques *in vivo* (Golman et al., 2000; Matsumoto et al., 2009). Des agents de contraste paramagnétique, sont utilisés pour améliorer le signal du proton. Ces agents sont des radicaux libres, dérivés du trityl, tels que triarylmethyl et Ox-63. Ils sont reconnus pour leur solubilité élevée dans l'eau, leur stabilité biologique, leur faible toxicité chez les modèles animaux et leur spectre RPE ne présentant qu'une seule et unique raie (Ardenkjær-Larsen et al., 1998). Ces radicaux sont également dépendant de  $pO_2$ , ainsi l'imagerie rehaussée par effet Overhauser met en évidence les régions hypoxiques.

Les mesures de pH et de pression partielle en oxygène, sont essentiellement appliquées pour mettre en évidence les dérégulations métaboliques liées à des pathologies. La section

suivante est plus centrée sur l'activité enzymatique. Elle traite des travaux réalisés par le laboratoire d'accueil.

### Activité enzymatique

Un système macromoléculaire à base d'élastine nitroxylée (Parzy et al., 2013) a été développé au laboratoire. Les caractéristiques RPE de l'électron dans ces conditions sont telles que la saturation des spins est difficile voire impossible en raison d'un temps de corrélation de rotation trop élevé (Mellet et al., 2009). En revanche, la protéolyse de l'élastine par l'élastase du neutrophile fragmente la macromolécule en petits peptides dont la signature RPE permet l'effet Overhauser, et ainsi l'IRM rehaussée *in vitro* à 0.2T. Cette approche a été transposée *in vivo* pour révéler la protéolyse digestive dans la souris. Après un gavage oral avec de l'élastine nitroxylée, le substrat est digéré par l'élastase pancréatique. Une amplification significative du signal d'un facteur 7,2 a été observée dans le duodénum de souris saine. Aucun rehaussement n'a été mesuré avec la sonde sous sa forme initiale (Koonjoo et al., 2014).

Une approche alternative originale a été développée dans le même laboratoire en étroite collaboration avec l'Institut de Chimie Radicalaire à Marseille. Un nitroxyde proshorylé présentant 6 raies RPE a été développé. Sous sa forme d'acétyle (substrat d'hydrolyse) la position de ses résonances varie au regard de sa forme cétone (produit d'hydrolyse) en raison du changement important de couplage scalaire électron-phosphore (figure 14). Ainsi selon la fréquence de saturation de l'électron, il a été possible de détecter par effet Overhauser distinctement et sans ambiguïté, le substrat ou le produit d'hydrolyse par la pepsine avec un rehaussement respectivement de 6 et 8,5 dans l'estomac (Audran et al., 2015). Cependant dans ce cas précis, la protéolyse n'était pas spécifique à une enzyme.

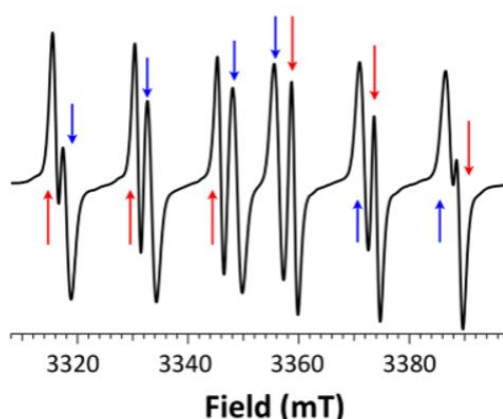


Figure 14 : Spectres RPE.

Superposition des spectres à six raies du substrat (indiqué par les flèches bleues) et du produit

( indiqué par les flèches rouge) (Audran et al., 2015)

Dans le cadre de pathologies inflammatoires pulmonaires, un cap devait donc être franchi dans le but de visualiser *in vivo* une activité protéolytique qui soit spécifique d'une enzyme déterminée et caractéristique de l'inflammation. Pour le modèle d'étude qui est la souris, des développements ont donc été nécessaires en termes de sondes radicalaires et d'imagerie rehaussée par effet Overhauser dans le poumon à 0.2T.

## 1.5. Objectifs

Le cadre général de ce travail de thèse est la détection *in vivo* par IRM rehaussée par effet Overhauser de l'activité protéolytique anormale dans les poumons de souris en situation inflammatoire. En rapport avec les collaborations passées et présentes du laboratoire d'accueil, l'étude se focalisera sur l'élastase du neutrophile puisque cette enzyme est présente en grande quantité en cas d'inflammation.

Le premier objectif a été de développer une méthode d'IRM du poumon de la souris rehaussée par effet Overhauser. Une séquence radiale à Temps d'Echo Ultra court (UTE) 3D et une séquence cartésienne 3D en écho de spin accélérée ont été développées afin d'évaluer *in vitro* leur potentiel dans la visualisation du poumon et leur compatibilité avec l'utilisation de l'effet Overhauser.

Le deuxième objectif a été de mesurer *in vivo* la présence de nitroxydes témoins dans les poumons de souris pour valider les méthodes développées.

Le troisième objectif a été de confirmer la spécificité de l'enzyme cible pour une nouvelle molécule substrat de l'élastase du neutrophile. Des tests d'activités enzymatiques de l'élastase du neutrophile *in vitro* avec la sonde ont été réalisés non seulement avec l'enzyme isolée mais aussi *ex vivo* sur des lavages broncho alvéolaires de poumons de souris infectées par *Pseudomonas aeruginosa*.

Enfin les tests préliminaires de détection par IRM rehaussée par effet Overhauser de l'activité protéolytique de l'élastase du neutrophile seront décrits et discutés.



## 2. Éléments théoriques de la polarisation dynamique nucléaire par effet Overhauser

Dans cette partie, l'intérêt est porté exclusivement à l'effet Overhauser des radicaux libres dans les liquides. La PDN dans les liquides, et par extension les applications en imagerie OMRI (IRM rehaussée par effet Overhauser), PEDRI font appel à l'effet Overhauser. Cette approche permet de rehausser la polarisation RMN du proton de l'eau grâce à la saturation des transitions électroniques d'un électron non apparié du radical libre dilué dans l'eau.

En 1953, Albert W. Overhauser prédit que la saturation des spins électroniques de conduction d'un métal par irradiation micro-onde provoque une augmentation de la polarisation des spins nucléaire du métal (Overhauser, 1953). Cette même année, cette prévision fut confirmée expérimentalement avec un métal de lithium par Carver et Slichter (Carver and Slichter, 1953). Plus tard, ces derniers ont expérimentalement vérifié que l'effet peut être observé avec d'autre système comme les noyaux de  ${}^7\text{Li}$ ,  ${}^{23}\text{Na}$ ,  ${}^1\text{H}$  (Carver and Slichter, 1956) et des solutions aqueuses (Abragam, 1955)

Il faudra attendre 1988 et 1990 pour que les premières images IRM associées à l'effet Overhauser dans les liquides soient publiées. Lurie obtint une image *in vitro* (Lurie et al., 1988), suivi par Grucker qui réalisa une image de la biodistribution de radicaux libres chez un rat suite à une injection intra péritonéale (Grucker, 1990).

On ne présentera ici que la description de l'effet Overhauser à champ élevé. Les aspects théoriques concernant les états Zeeman et les transitions RPE de l'électron en interaction hyperfine avec un spin entier comme le  ${}^{14}\text{N}$  d'un nitroxyde, ou même à plusieurs spins, à champ fort ou faible, de même que la description de l'effet Overhauser à champ faible dans ces cas ne seront pas traités ici. Pour plus de détails concernant ces aspects, il conviendra de consulter d'excellents ouvrages ou publications (Abragam, 1961); (Guiberteau, 1994); (Madelin, 2005); (Shakirov et al., 2006); (Lingwood et al., 2010). On considèrera l'interaction entre le proton de l'eau et le spin de l'électron dans un nitroxyde à trois bandes (interaction hyperfine avec le  ${}^{14}\text{N}$ ) ou à six bandes (interaction hyperfine supplémentaire avec le  ${}^{31}\text{P}$ ).

Dans ce système, les deux spins, I le spin nucléaire du proton ( $I=1/2$ ) et S, le spin électronique du radical libre ( $S=1/2$ ) sont suffisamment proche dans l'espace pour manifester des interactions scalaires et ou dipolaires.

L'application d'un champ magnétique  $B_0$  permet une levée de dégénérescence des niveaux d'énergie de spin. C'est l'effet Zeeman. Le système, impliquant deux spins de nombre quantique  $1/2$ , possède quatre états notés  $|m_S m_I\rangle$  (figure 15). On nommera les probabilités de transition par unité de temps  $W_i$  avec  $i=0, 1, 2$ , le nombre de quanta de moment cinétique impliqués.

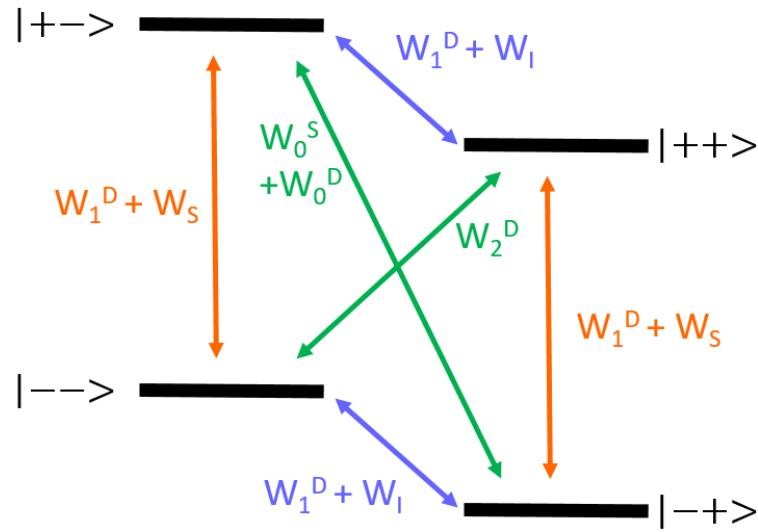


Figure 15 : Diagramme des états selon leurs niveaux d'énergie et des probabilités de transition d'un système SI à deux spins, S pour l'électron et I pour le proton.

L'énergie d'interaction associée à l'ensemble du système se calcule selon l'opérateur d'Hamilton (H). C'est la somme des Hamiltoniens Zeeman électronique ( $H_S$ ), Zeeman nucléaire ( $H_I$ ) et d'interaction entre S et I ( $H_{IS}$ ) comprenant les interactions dipolaire et scalaire.

$$H = H_S + H_I + H_{IS} \quad (2.1)$$

Avec

$$H_S = \gamma_S \hbar B_0 S \quad (2.2)$$

$$H_I = \gamma_I \hbar B_0 I \quad (2.3)$$

$$H_{IS} = \frac{2\mu_0 \gamma_I \gamma_S \hbar^2}{3} |\Psi(0)|^2 (\vec{I} \cdot \vec{S}) + \frac{\mu_0 \gamma_I \gamma_S \hbar^2}{4\pi r^3} [(\vec{I} \cdot \vec{S}) - 3(\vec{I} \cdot \vec{r}_u)(\vec{S} \cdot \vec{r}_u)] \quad (2.4)$$

Avec r la distance entre les deux spins,  $\vec{r}_u = \frac{\vec{r}}{r}$  le vecteur unité sur l'axe entre deux spins,  $\gamma_i$  est le rapport gyromagnétique du spin i.

Le premier terme de l'équation (2.4) définit l'**interaction scalaire**, aussi connue sous le nom de « contact de Fermi ».

Le deuxième terme de l'équation (2.4) concerne l'**interaction dipolaire**.

A partir de la théorie de Solomon (Solomon, 1955) qui prend en compte toutes les probabilités de transitions du système représenté en figure 15, la polarisation nucléaire  $\langle I_Z \rangle$  est défini comme suit:

$$\begin{aligned}\frac{d\langle I_Z \rangle}{dt} &= -(W_0 + 2W_1 + W_2)[\langle I_Z \rangle - I_0] - (W_2 - W_0)[\langle S_Z \rangle - S_0] \\ \frac{d\langle S_Z \rangle}{dt} &= -(W_2 - W_0)[\langle I_Z \rangle - I_0] - (W_0 + 2W_1' + W_2)[\langle S_Z \rangle - S_0]\end{aligned}\tag{2.5}$$

En fixant :

$$\begin{aligned}W_0 &= W_0^D + W_0^S \\ W_1 &= W_1^D + W_1 \\ W_1' &= W_1^D + W_S \\ W_2 &= W_2^D\end{aligned}\tag{2.6}$$

Les exposants D et S indiquent dipolaire et scalaire.

La solution à l'équation (2.5) pour  $\frac{d\langle I_Z \rangle}{dt} = 0$  à l'état stationnaire est :

$$\langle I_Z \rangle = I_0 + \rho * f * (\langle S_Z \rangle - S_0)\tag{2.7}$$

$I_0$  et  $S_0$  désignent la polarisation du proton et de l'électron non apparié à l'état d'équilibre,  $\rho$  est le facteur de couplage électron noyau et  $f$  le facteur de fuite

**Facteur de couplage  $\rho$**

$$-1 < \rho < \frac{1}{2}$$

$$\rho = \frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_1 + W_2}\tag{2.8}$$

Ce facteur indique sur la nature de l'interaction entre l'électron non apparié et le proton. Sa valeur est comprise entre -1, lorsque l'interaction électron noyau est purement scalaire et 0,5 dans le cas où le couplage est purement dipolaire.

2. Eléments théoriques de la polarisation dynamique nucléaire par effet Overhauser

- Interaction purement scalaire : Les  $W_i^D = 0$  ( $i = 0, 1, 2$ ), d'où  $\rho = -1$ . Compte tenu que cette interaction nécessite un recouvrement des fonctions d'onde des spins I et S, cette interaction est peu probable dans les liquides où les partenaires sont très mobiles.
- Interaction purement dipolaire et rétrécissement extrême ( $\omega\tau_c \ll 1$ , avec  $\tau_c$  le temps de corrélation de rotation des molécules de la solution) : Les probabilités de transitions dipolaires suivent les proportions suivantes  $W_0^D/W_1^D/W_2^D \equiv 2/3/12$ , d'où  $\rho = 1/2$ . Dans ce cas on observe un changement de phase du signal RMN. Dans une solution de radicaux libres, l'interaction prédominante entre les spins nucléaires et électroniques est l'interaction dipôle-dipôle.

**Facteur de fuite f**

$$0 < f < 1$$

$$f = \frac{W_0 + 2W_1 + W_2}{W_0 + 2W_1 + W_2 + 2W_I} \quad (2.9)$$

Avec  $W_I$ , les probabilités de transition entre les états Zeeman nucléaires en l'absence de radical.

Ce facteur correspond à la proportion prise par la relaxation paramagnétique due à la présence de l'électron par rapport à la relaxation longitudinale totale du spin I. Ce facteur est accessible via le taux de relaxation nucléaire spin-réseau ( $R_1$ ) en présence du spin électronique.

$$W_0 + 2W_1 + W_2 + 2W_I = R_1 = \frac{1}{T_1} \quad (2.10)$$

De même que  $W_I$  est accessible via la mesure de la constante de temps de relaxation nucléaire spin-réseau ( $R_{10}$ ) en l'absence du spin électronique.

$$W_I = R_{10} = \frac{1}{T_{10}} \quad (2.11)$$

De ce fait, en remplaçant les termes dans l'équation (2.9),

$$f = 1 - \frac{T_1}{T_{10}} \quad (2.12)$$

Le facteur de fuite est déterminé via le rapport des constantes de temps de relaxation longitudinale du nitroxyde en solution ( $T_1$ ) et du solvant en l'absence du radical ( $T_{10}$ ). Il peut également se définir en fonction de la relaxivité de l'agent de contraste  $r_1$  et la concentration  $C$  du radical. Les valeurs  $T_1$  et  $T_{10}$  peuvent être mesurées en effectuant des expériences IRM avec un motif d'inversion sur ces échantillons. De ce fait la valeur  $r_1$  peut être retrouvée

$$\frac{1}{T_1} = r_1 C + \frac{1}{T_{10}} \quad (2.13)$$

Donc le facteur de fuite est compris entre 0 (aucune contribution de radical) et 1 (relaxation contrôlée par les radicaux).

### Rehaussement E (effet Overhauser)

En réarrangeant l'équation (2.7), celle-ci peut notamment s'écrire sous la forme suivante :

$$E = 1 + \frac{\rho f s \gamma_S}{N \gamma_I} = \frac{\langle I_Z \rangle}{I_0} \quad (2.14)$$

Avec  $N$  le nombre de raies impliqué dans le spectre d'un nitroxyde,  $s$  le facteur de saturation,  $\gamma_S$  et  $\gamma_I$  les rapports gyromagnétiques respectivement de l'électron et du noyau.

### Facteur de saturation $s$

$$0 < s < 1$$

$$s = \frac{S_0 - \langle S \rangle}{S_0} = \frac{\gamma_S^2 B_1^2 T_{1S} T_{2S}}{1 + \gamma_S^2 B_1^2 T_{1S} T_{2S} + (\omega - \omega_S)^2 T_{2S}^2} \quad (2.15)$$

Avec  $\omega_S$  la fréquence angulaire de résonance des électrons,  $B_1$  le champ radiofréquence de fréquence angulaire  $\omega$  (en général des micro-ondes) utilisé pour la saturation des transitions RPE,  $T_{1S}$  et  $T_{2S}$  les temps de relaxation longitudinale et transverse des électrons.

Le facteur de saturation représente l'efficacité de la saturation électronique. Il dépend de la puissance et de la durée d'application de l'onde hyperfréquence. Il est compris entre 0 (à l'équilibre thermique) et 1 (à saturation complète). Compte tenu que ce facteur dépend aussi de la largeur de résonance RPE de l'électron, un élargissement des raies (diminution du  $T_2$  de l'électron) entrainera *de facto* une diminution du facteur  $s$ . Un tel effet peut survenir pour

des raisons variées, comme par exemple une mobilité réduite de l'électron ou la présence d'un excès d'agents de relaxation paramagnétiques.

Dans l'hypothèse où l'interaction électron-proton est dipolaire et dans des conditions optimales de saturation et de fuite, le rehaussement maximal attendu par une saturation électronique mono-bande est de -109 pour un nitroxyde à 3 raies et de -55 pour un nitroxyde à 6 raies.

Le terme  $E$  étant négatif, à l'exception des valeurs entre 0 à 1, le signal IRM change de phase de  $180^\circ$  due à l'inversion négative de la polarisation  $^1\text{H}$  via l'effet Overhauser, tandis que la magnitude du signal varie selon la valeur absolue de  $E$  lors de l'irradiation RPE (Lurie et al., 1989).

Sachant que  $E$  dépend de la concentration du nitroxyde (équations 2.12 et 2.13). Liebgott et Lie ont montré expérimentalement que le rehaussement peut être biphasique avec certains nitroxydes (Li et al., 2006);(Li et al., 2006). Le rehaussement  $E$  augmente avec la concentration jusqu'à un point culminant, puis décroît. Ceci peut être dû à un élargissement des résonances RPE à hautes concentrations de nitroxydes, induisant de ce fait une réduction du facteur de saturation. Ainsi, dans certaines conditions expérimentales où l'effet Overhauser est très faible et difficilement mesurable en magnitude, la mesure des images de phase pourra être utilisée pour interpréter la présence de l'effet Overhauser.

### 3. Matériels et Méthodes

La section suivante décrira les moyens mis en œuvre pour ce projet : l'équipement OMRI, les séquences programmées pour réaliser de l'imagerie du poumon et les nitroxydes utilisés et pour finir les procédures expérimentales.



### 3.1. Equipements expérimentaux

#### 3.1.1. IRM

L'IRM corps entier (Cirrus Open, MRI-Tech, Canada), utilise un aimant permanent composé d'un alliage de Nd/Fe/B. Son champ  $B_0$  de 0.194T est orienté selon l'axe Z (vertical). L'intensité maximale des gradients est de 20mT/m dans les 3 directions de l'espace. L'imagerie du proton est réalisée à partir d'une antenne à la fois émettrice et réceptrice. C'est une antenne volumique en forme de selle de cheval de dimension 28 mm de diamètre et 29 mm de longueur. Elle est accordée pour des fréquences de résonance de 8.24MHz pour le proton. Cette antenne est incorporée à une cavité micro-onde permettant la RPE dans le champ magnétique (figure 16).



Figure 16 : Photographies de l'IRM 0.194T et de la cavité résonante RPE, placée au centre de l'aimant

#### 3.1.2. Cavité RPE

La cavité micro-onde ou RPE (Bruker, Wissembourg, France) permet de réaliser l'expérience à double résonance. Son rôle est d'assurer une saturation des radicaux libres, afin que par effet Overhauser, le transfert de polarisation des électrons aux protons puisse s'effectuer.

### Conception

Cette cavité (initialement construite par Bruker (Wissembourg, France) se compose d'un cylindre de diamètre 240mm et 28 mm d'épaisseur. Le cylindre est percé en son centre (ouverture 30 mm) pour permettre le passage d'un échantillon et de l'antenne RMN qui est raccordée au système IRM. Le mode électromagnétique est le mode Transverse-Electrique TE011 qui permet théoriquement une concentration de la composante magnétique au centre de la cavité et un éloignement de la composante électrique à la périphérie (figure 17), ce qui permet de limiter l'échauffement de l'échantillon par pertes diélectriques. L'épaisseur de la cavité, 28 mm, correspond à une demi-onde d'un rayonnement à 5.4GHz. Les parois métalliques de la cavité initiale ont été remplacées par de la résine recouverte d'argent, pour minimiser les courants de Foucault et pour faciliter le réglage de la fréquence d'accord. Des détails peuvent être trouvés dans l'article de Massot et al. (2009). Un système de chauffage par eau a été ajouté de part et d'autre des ouvertures pour maintenir le modèle animal étudié à sa température corporelle.

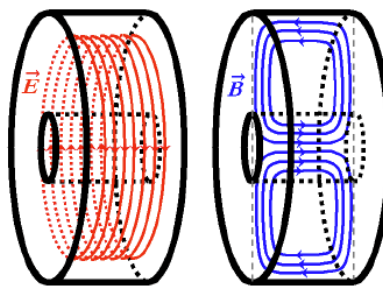


Figure 17 : Mode TE011 dans la cavité RPE. Le champ magnétique  $\vec{B}$  (en bleu) est concentré à la position de l'échantillon tandis que le champ électrique  $\vec{E}$  (en rouge) est éloigné à la périphérie de la cavité afin de limiter l'échauffement tissulaire.

### Ajustements

Des vis disposées de chaque côté de la cavité, permettent d'incurver les parois flexibles et régler ainsi manuellement la fréquence RPE en faisant varier l'épaisseur de la cavité. La figure d'accord (fréquence et adaptation) est mesurée à l'aide d'un analyseur réseau (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Outre le réglage par l'épaisseur de la cavité, un circuit d'accord et d'adaptation est placé en amont de la cavité.

### Le montage

Le montage des expériences est décrit par la figure 18. L'hyperfréquence est générée par un ensemble générateur de fréquence HP 8657 A 0.1-1040 MHz (Hewlett-Packard, CA, Etats-Unis) et deux étages d'amplificateur (RFPA, Artigues-pres-Bordeaux, France), 10W et 100W, qui sont reliés, par un câble coaxial, à la cavité RPE. Le premier étage d'amplification effectue aussi une multiplication de la fréquence synthétisée par 6. La puissance maximale en sortie de deuxième étage est de 80W.

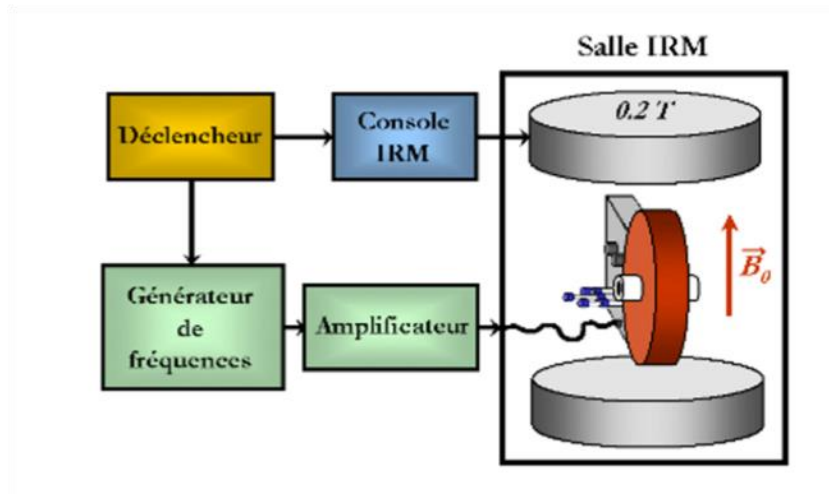


Figure 18 : Montage expérimental du banc de PDN.

Pour les acquisitions OMRI, la saturation électronique est continue et a été intégrée aux séquences d'imagerie. Elle se déclenche dès le lancement de la séquence d'imagerie ou peut également être activée manuellement via un déclencheur.

#### 3.1.3. Spectromètre RPE

Les spectres RPE ont été effectués par spectromètre EMXnano EPR (BRUKER, Allemagne), fonctionnant à une hyperfréquence de 9.6 GHz (soit 0.34T). Les paramètres d'acquisition RPE sont les suivants : balayage en champ = 120 G, balayage temporel = 10 s, atténuation = 6 dB; modulation amplitude = 1 G; gain = 50 dB.

## 3.2. Développement des séquences OMRI du parenchyme pulmonaire

Ces développements visent à obtenir un signal de RMN significatif dans les poumons, organe présentant un T2\* court, en 3D et dans une durée suffisamment brève pour limiter l'échauffement par pertes diélectriques lorsque la saturation des spins électroniques est enclenchée. Deux approches ont été envisagées : une séquence d'écho de spin accélérée (FSE) et un encodage radial à temps d'écho court (UTE).

### 3.2.1. Optimisation de la séquence FSE 3D

#### *Chronogramme*

La séquence FSE 3D dont le chronogramme est présenté en figure 19, consiste à appliquer une série d'impulsions RF composée d'une impulsion RF à 90° suivi d'un train d'impulsions de refocalisation de l'aimantation transverse à 180°. En un seul temps de répétition (TR), elle génère un train d'écho. Entre chacun des échos, l'amplitude du gradient de codage de phase est modifiée afin de balayer plusieurs lignes de l'espace de Fourier durant le délai TR. Dans notre cas, le premier écho acquis correspond à la ligne centrale du plan de Fourier, afin de limiter au maximum le temps d'écho effectif et ainsi favoriser le signal. Les lignes suivantes sont acquises séquentiellement de part et d'autre de la ligne centrale. En raison des dimensions de la cavité et des volumes des objets étudiés qui occupait entièrement le champ de vue utile, le gradient de sélection de coupe a été retiré de la séquence. La durée de l'impulsion RF est de 200  $\mu$ s.

Lors de cette étude, le facteur d'accélération est de 16, ainsi 16 échos ont été acquis par TR. Une accélération plus grande a conduit à une forte dégradation de l'image. Le TR a été choisi à 600 ms pour obtenir le retour presque complet de l'aimantation longitudinale dans les conditions *in vivo*.

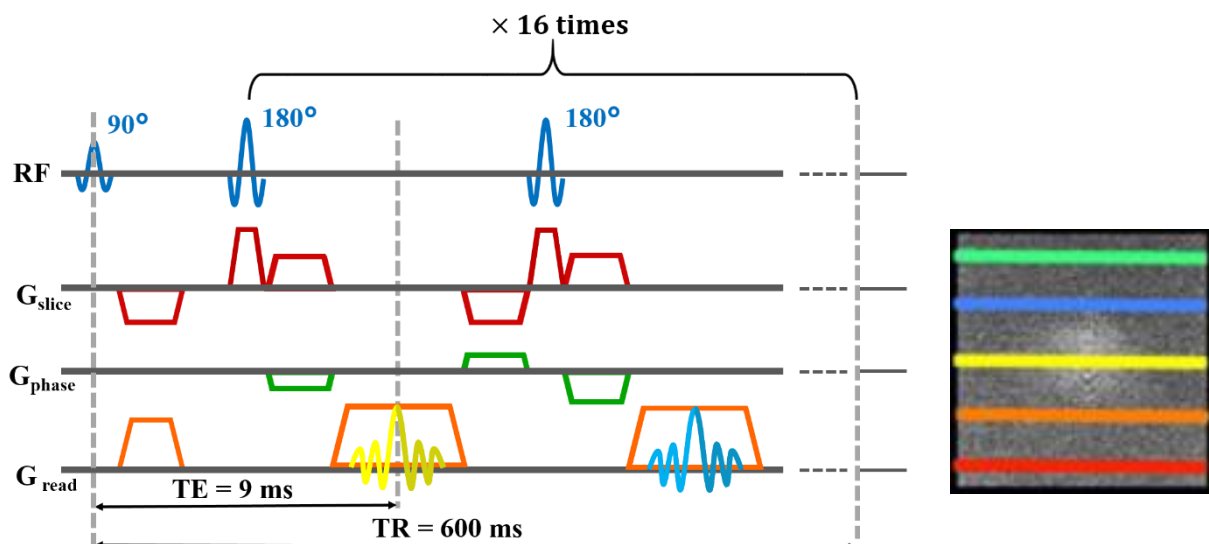


Figure 19 : Chronogramme de la séquence FSE 3D et le mode de remplissage du plan de Fourier

Lorsque la saturation RPE est appliquée, la matrice d'acquisition est réduite pour limiter la durée d'acquisition à 38 secondes pour une résolution millimétrique. De plus, l'application de l'irradiation micro-onde n'a pas lieu pendant toute la durée de d'acquisition de cette matrice incomplète. Pour éviter un trop grand échauffement, seules les lignes centrales (16x16 lignes) sont acquises en présence d'effet Overhauser.

Par contre, l'acquisition d'images de meilleure résolution ( $1 \times 0.5 \times 0.5 \text{ mm}^3$ ) comme images anatomiques de références sans effet Overhauser nécessite 10 minutes avec 4 accumulations.

Les paramètres d'acquisitions ont été regroupés dans le tableau 1.

	Matrice	FOV (mm)	Résolution (mm)	TE / TR (ms)	NA	Temps d'acquisition
<b>Incomplète</b>	64x32x32	64x32x32	1x1x1	9 / 600	1	38 secondes
<b>Résolue</b>	64x64x64	64x32x32	1x0.5x0.5	9 / 600	4	10.2 minutes

Tableau 1: Paramètres d'acquisition de la séquence FSE 3D

#### Sous échantillonnage Keyhole

L'objectif général en imagerie est d'obtenir une image rapidement et de bonne qualité. Or en IRM comme pour tout processus d'acquisition de signaux, il y a un compromis à établir entre durée d'acquisition et qualité des signaux acquis.

Pour augmenter la vitesse d'acquisition, il peut paraître intuitif en imagerie cartésienne d'acquérir partiellement la matrice d'acquisition (partie centrale) et compléter celle-ci en périphérie par des données nulles. Si on applique un tel paradigme, l'image peut être fortement dégradée en résolution et présenter des artéfacts de troncature après transformée de Fourier si le sous échantillonnage est trop sévère.

Pour faire face à ce compromis Vaals a présenté une stratégie appelé « keyhole » (Van Vaals et al., 1993). Le principe étant d'acquérir deux jeux de données :

- Une matrice de référence ayant toute ses données brutes.
- Une matrice partiellement acquise, n'ayant que les données brutes de basses fréquences spatiales.

Au lieu de compléter la matrice sous échantillonnée par des zéros, celle-ci est complétée par les données de hautes fréquences de la matrice de référence afin de préserver la résolution. La figure 20 illustre le concept du keyhole.

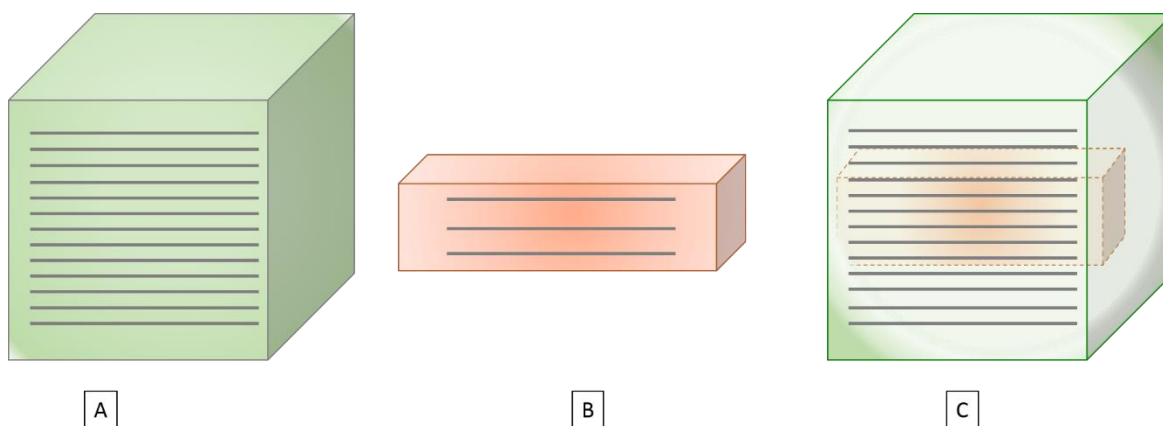


Figure 20 : Principe du keyhole

- A) Matrice de référence acquise sans saturation RPE (haute résolution)
- B) Matrice partielle acquise avec saturation RPE (basse résolution)
- C) La combinaison des données brutes correspond à remplacer le centre de la matrice de référence par la matrice partielle.

La reconstruction du keyhole a été développée sur le logiciel Matlab et adaptée aux acquisitions OMRI. L'image rehaussée par effet Overhauser est celle qui est acquise à basse résolution : la matrice est tronquée d'un facteur 2 dans les directions de phase et de coupe. La matrice est ensuite complétée par les données périphériques des données acquises sans effet Overhauser (haute résolution). Comme le nombre d'accumulations pour la matrice complète est supérieur à celui de la matrice incomplète pour l'OMRI, les données périphériques sont multipliées par un facteur 0,25 avant d'être incorporées aux données d'OMRI afin d'éviter un brusque changement de signal dans le volume de Fourier.

### 3.2.2. Implémentation de la séquence UTE 3D

La séquence radiale est une alternative à la séquence cartésienne. Son mode de remplissage lui procure une meilleure robustesse vis-à-vis des artéfacts de mouvements, comparé à la séquence FSE. (Glover and Pauly, 1992).

Introduit pour la première fois par Lauterbur en 1973 (Lauterbur, 1973) sous le nom de « zeugmatographie », le mode de remplissage radial proposé, s'effectuait par des projections inscrites dans une boule. Ces projections correspondait à des diamètres (Lai and Lauterbur, 1981). Cette séquence fut la première séquence servant à imager le parenchyme pulmonaire (Bergin et al. 1991).

Pour la séquence radiale UTE, le remplissage du plan de Fourier s'effectue par des rayons. Elle se caractérise par un TE de l'ordre de la dizaine de microsecondes permettant de recueillir le signal avant sa décroissance dans le plan transverse. De ce fait cette séquence est initialement utilisé pour l'imagerie de tissus à T2\* court tels que les os, les tendons et bien sûr les poumons.

Au cours de ces dernières années, le laboratoire d'accueil s'est fortement intéressé à l'optimisation de la séquence UTE en IRM cardiaque du petit animal à haut champ (Trotier et al., 2015a, 2015b, 2016). La séquence UTE 3D a été intégrée et développée sur l'imageur 0,2T et ensuite optimisée afin de répondre à nos exigences.

#### *Séquence d'acquisition*

La séquence UTE 3D représentée en figure 21. Une impulsion RF carré et non sélective est utilisée. Elle immédiatement suivie par la lecture du signal de précession libre avec l'application simultanée des 3 gradients d'encodage de l'espace. La forme des gradients est trapézoïdale et l'échantillonnage du signal débute dès leurs montées. Ainsi, le temps d'écho (TE) se définit comme étant l'intervalle entre milieu de l'impulsion RF et le début de la montée des gradients.

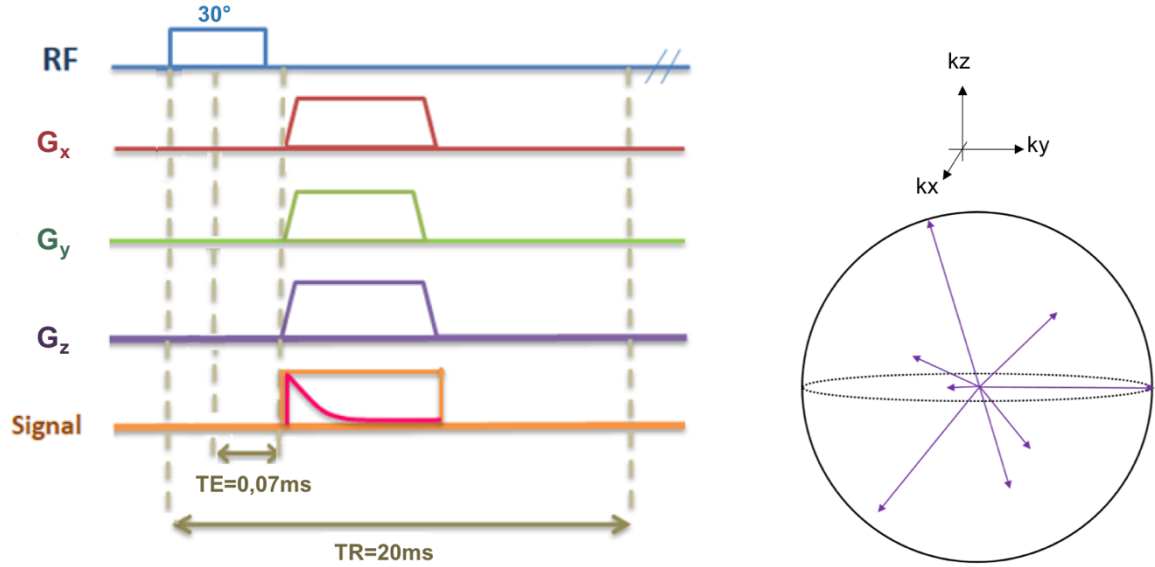


Figure 21 : Chronogramme de la séquence UTE 3D et le mode de remplissage du plan de Fourier

### Trajectoires

L'espace  $k$  est balayé suivant une géométrie sphérique où le remplissage s'effectue suivant des rayons (figure 21) induisant un échantillonnage dense des basses fréquences. Le nombre de projection  $N_p$  est déterminé par l'équation (3.1) afin de respecter la règle de Nyquist :

$$N_p = 4\pi R^2 \quad (3.1)$$

Avec  $R$  le nombre de point échantillonné par projection.

A chaque  $TR$ , les gradients commutent et leurs intensités sont modifiées en fonction des coordonnées  $k_x$ ,  $k_y$  et  $k_z$  de la projection radiale à recueillir. Ces coordonnées sont déterminées par les équations suivantes :

$$\begin{aligned} k_x &= k_{max} \cos(\varphi) \sin(\theta) \\ k_y &= k_{max} \sin(\varphi) \sin(\theta) \\ k_z &= k_{max} \cos(\theta) \end{aligned} \quad (3.2)$$

Avec  $k_{max}$  la position du point échantillonné la plus éloignée du centre de l'espace de Fourier,  $\theta$  et  $\varphi$  sont des angles polaires tels que  $0 < \theta < \pi$  et  $0 < \varphi < 2\pi$ .



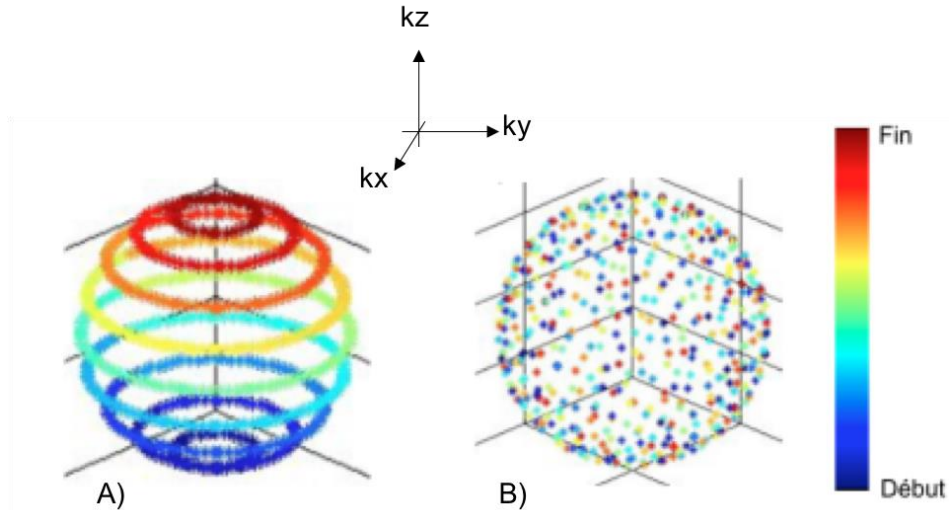


Figure 22: Remplissage radial (Trotier, 2015)

- A) Remplissage régulier de la matrice
- B) Remplissage par angle d'or

En incrémentant de manière régulière les angles  $\theta$  entre 0 et  $\pi$  et  $\varphi$  entre 0 et  $2\pi$  (figure 22A), le remplissage de la boule nécessite la totalité des rayons. Cela impose un temps d'acquisition long. Or, les conditions pour réaliser de l'imagerie OMRI *in vivo* requiert un temps d'acquisition court pour limiter le réchauffement de l'animal. Pour réduire la durée d'acquisition, une méthode utilisant une répartition régulière d'un faible nombre de rayons, basée sur un double angle d'or a été privilégiée.

L'angle d'or permet un remplissage plus rapide de la sphère, comme il est possible de le voir sur la figure 22B, où l'on peut constater que même pour un petit nombre de trajectoires (points bleus) les rayons échantillonnés décrivent une sphère.

Les angles polaires ont donc été redéfinis :

$$\begin{aligned}\theta_i &= 2 \times \cos^{-1}(\text{mod}(0,6823 \times i, 1)) - 1 \\ \varphi_i &= 2\pi \times \text{mod}(0,4656 \times i, 1)\end{aligned}\quad (3.3)$$

Avec  $i$  le numéro de la projection radiale.

Les trajectoires via l'angle d'or ont été définies en substituant les angles polaires des équations 3.2 par ceux des équations 3.3. Ainsi la méthode se basant sur l'angle d'or permet de reconstruire des images intermédiaires avec un nombre sous échantillonné de projections de l'espace de Fourier pour un temps d'acquisition réduit. Cette méthode facilite l'usage de la séquence UTE pour les études dynamiques.

Comme pour toute acquisition radiale dont les données brutes sont réparties régulièrement sur chaque rayon, l'espace de Fourier est échantillonné suivant une grille non

cartésienne. La transformée de Fourier inverse ne peut pas être directement appliquée. La procédure de reconstruction impose une étape intermédiaire qui est un remaillage. L'algorithme de reconstruction d'image a été réalisé avec le logiciel Matlab.

#### *Algorithme de reconstruction*

Le remaillage est une interpolation consistant à réorganiser les données du plan radial sur une grille cartésienne. La procédure de remaillage des trajectoires radiales suit quatre étapes principales (Wajer et al., 2000) : la compensation de densité, convolution avec un noyau maillant, une transformée de Fourier inverse et une dé-apodisation.

#### Compensation de densité

La densité des données acquises par échantillonnage radial n'est pas uniforme dans le plan de Fourier, puisque les données acquises à basse fréquence (au centre de l'espace de Fourier) sont largement sur-échantillonnées par rapport aux hautes fréquences. La fonction compensation de densité affecte une pondération à chacune des données brutes de l'espace de Fourier.

#### Convolution

Une fois la pondération appliquée, les points échantillonnés sont redistribués sur une grille cartésienne selon un noyau. En pratique cette opération d'interpolation est effectuée par une convolution avec le kernel Kaiser-Bessel, dont l'idée est schématisée par la figure 23. Ce noyau est bon choix pour sa qualité d'interpolation et sa rapidité de reconstruction (O'Sullivan, 1985).

Ce kernel s'écrit comme :

$$K_{KB}(d) = \begin{cases} \frac{1}{L} I_0 \left( \beta \sqrt{1 - (2d/L)^2} \right) & |d| \leq \frac{L}{2} \\ 0 & \text{autrement} \end{cases} \quad (3.4)$$

Où  $L$  est la taille du kernel,  $I_0$  est la fonction de Bessel modifiée de première espèce d'ordre 0,  $\beta$  correspond à un facteur de forme (Beatty et al., 2005) et  $d$  représente la distance entre un point acquis et un point de la grille cartésienne.

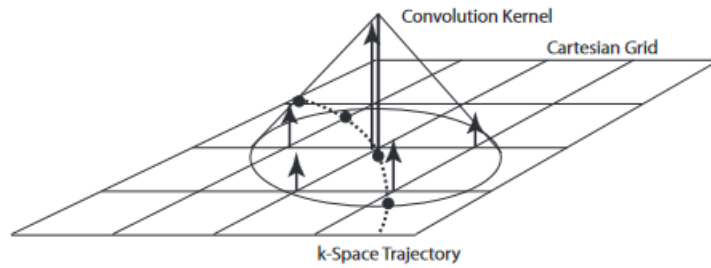


Figure 23 : Représentation de la procédure de remaillage. Les données échantillonnées (●) suivant la trajectoire radiale (en pointillées) sont superposées à une grille cartésienne. Chaque point échantillonné est convolué avec un kernel (en forme de cône). Image tirée de (JM. Pauly, 2013)

Pour les reconstructions d'images UTE, la taille du kernel était égale à 3 fois la variation de position de l'espace de Fourier cartésien entre chaque pas de codage ( $\Delta k$ ). Une fois l'opération de remaillage terminée, les points acquis sont répartis sur une grille, la transformée de Fourier peut donc être réalisée pour reconstruire l'image.

Notez que même avec un noyau de Kaiser-Bessel de largeur optimale, la grille, cependant, peut ajouter des artefacts de repliement résultant du rééchantillonnage rectiligne (Bernstein et al., 2004). Un choix judicieux pour une reconstruction précise, est d'augmenter la taille de la matrice d'un facteur 2 (et donc du champ de vue).

### Dé-apodisation

Après transformée de Fourier, l'image finale peut être affectée par une diminution d'intensité de signal au niveau des bordures. Cet effet de bordure appelé effet « rolloff ». La dé-apodisation consiste à corriger les effets secondaires liés à la convolution du kernel et de la matrice radiale, en divisant l'image reconstruite par la transformée de Fourier du kernel ;

$$FFT(K_{KB})(d) = \frac{\sin(\sqrt{(\pi Ld)^2 - \beta^2})}{\sqrt{(\pi Ld)^2 - \beta^2}} \quad (3.5)$$

A la fin du processus de remaillage, le champ de vue (FOV) est corrigé en utilisant seulement les voxels centraux de l'image reconstruite.

*Application du Keyhole*

Pour la séquence UTE 3D, le keyhole prend effet juste après la convolution. Il s'agira de compléter la matrice sous-échantillonnée avec les données provenant de la matrice complète.

Les paramètres d'acquisition étaient : durée de l'impulsion RF créneau = 50  $\mu$ s, TE = 70  $\mu$ s, TR = 20 ms et FOV = (40 mm)<sup>3</sup>.

La matrice de référence a été acquise en 4 min avec 11830 projections et 64 points échantillonnés par rayons. Pour les acquisitions OMRI, le nombre de projection a été sous échantillonnée d'un facteur 14, ce qui revient à 845 projections acquises en 17 secondes et 32 points ont été échantillonnés par projections.

### 3.3. Nitroxydes

Les acquisitions OMRI ont été réalisées avec deux types de nitroxydes ayant des signatures spectrales en RPE différentes.

Des nitroxydes vendus dans le commerce ont servi de témoin, pour réaliser des tests *in vitro* et *in vivo*. Des nitroxydes synthétisés par l'équipe des Pr Marque et Audran de l'Institut de Chimie Radicalaire de Marseille (UMR 7273) ont permis de développer l'IRM moléculaire de l'élastase du neutrophile dans les poumons de souris et dans les lavages broncho-alvéolaires de ces souris.

#### 3.3.1. Les nitroxydes témoins

Le 4-oxo-tempo (TXO), le 2,2,5,5-tetraméthyl-3-carboxylpyrrolidine-N-oxyl (PCA) et le 4-carboxy-tempo (figure 24) sont les nitroxydes témoins utilisés tout le long de cette thèse.

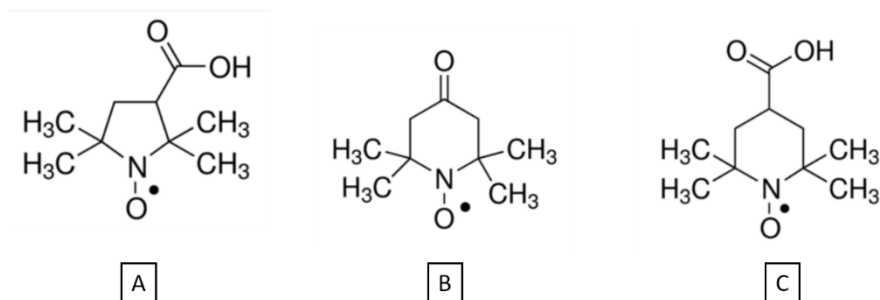


Figure 24 : Les nitroxydes témoins : A) 2,2,5,5-tetraméthyl-3-carboxylpyrrolidine-N-oxyl; B) 4-oxo-tempo; C) 4-carboxy-tempo

Ces nitroxydes présentent typiquement un spectre RPE à 3 raies en raison du couplage hyperfin  $a_N$  des électrons non appariés à l'azote-14 (spin 1). Les caractéristiques (constante de couplage  $a_N$ , largeur de raie et relaxivité  $r_1$  dans l'eau) de chacune de ces molécules ont été rassemblées dans le tableau 2.

	$a_N$ (G)	Largeur de raie (G)	$r_1$ (mM <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	Facteur de Lande $g_N$
PCA	16,24	1,34	0,37 ± 0,03	2,0051
4-oxo-Tempo	16,03	0,94	0,5	2,0054
4-carboxy-Tempo	17,18	1,65	0,45 ± 0,07	2,0057

Tableau 2 : Caractéristiques des nitroxydes témoins

### 3.3.2. Nitroxyde marqueur de l'élastase

Pour ce projet, un nitroxyde sous forme d'ester d'énol a été synthétisé. Il porte le nom de Methoxy-Succinyl-Alanine-Alanine-Proline-Valine-Nitroxyde (Meo-Suc-AAPV-nitroxyde). Il a été conçu de sorte à être un substrat spécifique de l'élastase du neutrophile, d'où le greffage du peptide Meo-Suc-AAPV. Une version sans méthyle (Suc-AAPV-nitroxyde) négativement chargée a aussi été synthétisée pour optimiser sa solubilité *in vivo*.

Ces agents radicalaires présentent tous deux un phosphore dans leur structure chimique ce qui leur confère un spectre à 6 raies.

Pour rappel, les nitroxydes sont sensibles à l'environnement dans lequel ils ont été introduits. Dans un milieu aqueux, en présence d'une enzyme, celle-ci va catalyser l'hydrolyse de la liaison nitroxyde-peptide et donner lieu à un produit (figure 25). Le produit de la réaction protéolytique est un nitroxyde sous forme de cétone.

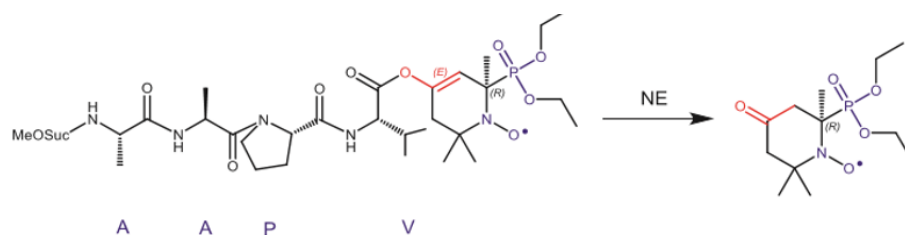


Figure 25 : Réaction protéolytique de Meo-Suc-AAPV-nitroxyde sous forme d'ester d'énol en nitroxyde sous forme de cétone par l'élastase du neutrophile.

Les propriétés spectrales RPE de l'ester d'énol sont très différentes de celles de la cétone (figure 26) en raison de l'écart de 5G entre leur constante de couplage  $a_P$ , reportés dans le tableau 3.

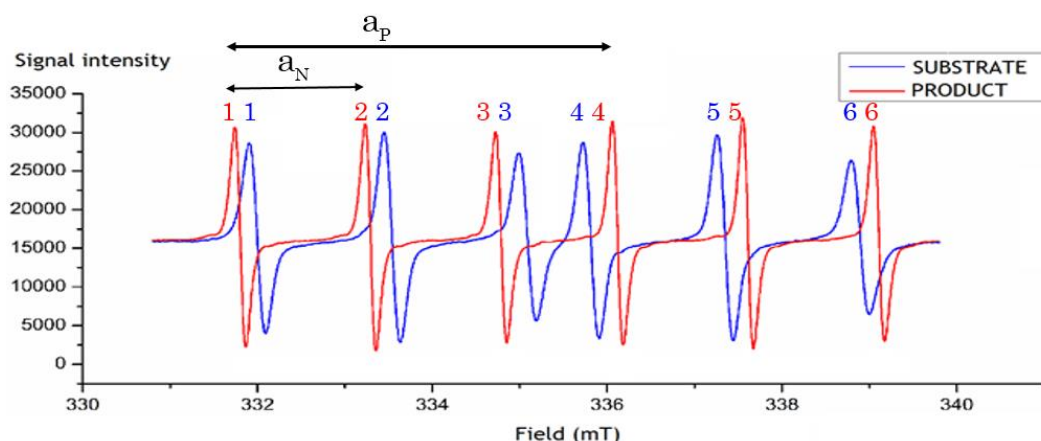


Figure 26 : Spectres RPE du substrat (en rouge) et du produit (en bleu)

	$a_N$ (G)	$a_P$ (G)	Largeur de raie (G)	Facteur de Lande $g_N$
Substrat	15,5	38,4	1,22	2,0052
Produit	14,9	43,3	1,84	2,0053

Tableau 3 : Paramètres RPE du substrat et du produit

L'écart en fréquence entre les résonances du substrat et du produit de la réaction est tel que l'irradiation RPE lors d'une expérience d'OMRI peut être choisie pour sélectionner spécifiquement la visualisation d'un des composés, à l'exclusion de l'autre. L'accès à l'activité enzymatique par spectroscopie RPE et par imagerie OMRI est ainsi rendue possible.

### 3.3.3. Fréquence de saturation

Le réglage de la cavité micro-onde à la fréquence de résonance du spin électronique du nitroxyde est crucial pour une saturation optimale. La fréquence d'irradiation donnée par l'équation (3.6) est ajustée sur le pic central du spectre RPE des nitroxydes témoins.

$$F_{RPE} = F_{RMN} \times \frac{\gamma_e}{\gamma_H} \times \frac{g_N}{g_e} \quad (3.6)$$

Avec  $F_{RMN}$  la fréquence de résonance du proton (8.24MHz à 0.2T),  $\gamma_e$  et  $\gamma_H$  les rapports gyromagnétiques respectifs de l'électron et du proton et  $g_e$  le facteur de Landé de l'électron qui vaut 2,0023.

Pour les nitroxydes à 6 raies, la cavité est réglée sur le 4<sup>ème</sup> pic des spectres de l'ester d'énol et de la cétone, où le décalage fréquentiel est assez grand pour prévenir le chevauchement.

Le calcul de la fréquence micro-onde ( $F_{RPE}$ ) tient compte des constantes de couplage et est donné par l'équation suivante :

$$F_{RPE} = F_{RMN} \times \frac{\gamma_e}{\gamma_H} \times \frac{g_N}{g_e} + a_N \pm \frac{a_P}{2} \quad (3.7)$$

Comme l'induction de l'aimant permanent varie selon la température ambiante, le réglage de la cavité est exécuté avant chaque expérience.

A partir des images acquises, le rehaussement du signal est calculé selon le rapport des signaux en magnitude avec et sans irradiation RPE.



## 3.4. Modèles Expérimentaux

### 3.4.1. Modèles *in vitro*

#### *Fantôme de résolution*

Les paramètres des séquences UTE 3D et FSE 3D ont été optimisés avec un fantôme de résolution. Ce fantôme est un ensemble de 5 tubes de 5 mm de diamètre et 40 mm de longueur :

- 4 tubes contenaient du gadolinium à 0,84 ; 1,67 ; 3,34 et 6,68 mM de concentration, dont les T1 sont respectivement de 200 ; 101 ; 54 et 24 ms.
- 1 tube rempli de TXO à 5 mM ayant un T1 de 454 ms.

Les paramètres d'acquisitions décrits ci-dessous ont permis d'obtenir des images de basse et haute résolution.

Les images en FSE 3D ont été acquises avec une matrice complète (64 x 64 x 64) pour un FOV de 64 x 32 x 32 mm. Sa résolution était de 1000 x 500 x 500  $\mu\text{m}$ , le nombre d'accumulation de 2, le facteur d'accélération de 16, les TE / TR de 9 / 600 ms et le temps d'acquisition de 5 minutes. Pour l'acquisition partielle, les seuls changements apportés sont le nombre d'accumulation qui a été réduit à 1 et la matrice qui est passé à 64 x 32 x 32. Le temps total d'acquisition était alors de 38 secondes et la résolution de (1000  $\mu\text{m}$ )<sup>3</sup>.

Les images UTE3D ont été acquises en un temps d'acquisition de 4 minutes, avec 11830 projections et 64 points échantillonnés par rayons. Après remaillage des données brutes, la matrice est considérée complète. Le FOV était cubique de (40 mm)<sup>3</sup> pour une résolution estimée à (0.31 mm)<sup>3</sup>. Pour obtenir la matrice partielle, le nombre de projection a été réduit à 845 et le nombre de point échantillonné à 32. La résolution était de (0.62 mm)<sup>3</sup> et le temps d'acquisition est passé à 17 secondes.

#### *Fantôme de cinétique*

Ce fantôme a été utilisé pour déterminer la fréquence optimale de saturation électronique du substrat et du produit. Il a également servi à suivre l'hydrolyse du substrat pour les expériences *in vitro*. Ce fantôme se composait d'un tube RMN de 5mm de diamètre contenant l'agent de contraste radicalaire (Succ-AAPV-nitroxyde ou nitroxyde-produit cétonique). Ce tube était lui-même inséré au centre d'un autre tube RMN de 10 mm de diamètre rempli d'eau distillée.

La séquence écho de gradient 2D a été utilisée suivant les paramètres d'acquisitions : TE = 20ms, TR = 200 ms, FOV = 40 x 40 mm<sup>2</sup>, Matrice 64 x 64, angle de bascule de l'impulsion radiofréquence = 30°, bande passante = 20kHz, épaisseur de coupe = 5 mm et une saturation continue durant toute la séquence d'acquisition OMRI, soit 12,8 s.

#### *Lavages Broncho-Alvéolaire*

Des lavages broncho-alvéolaires nous ont été envoyés par une équipe collaboratrice dirigé par le Dr Bentaher du Centre International de Recherche en Infectiologie à Lyon.

Deux modèles de souris C57BL6J ont été préparés en amont, le type sauvage (WT) et un modèle transgénique n'exprimant pas l'enzyme NE (KO-NE). Dans chacun de ces modèles, un lot a été instillé par voie intranasale avec du lipopolysaccharide *Pseudomonas aeruginosa* (LPS-Pa, Sigma-Aldrich, France), afin de créer une inflammation pulmonaire.

Le LPS est une endotoxine bactérienne qui s'est avéré déclencher une réponse pro-inflammatoire dans les poumons de souris. Ce modèle d'inflammation induite par le LPS reproduit les aspects des cascades inflammatoires associés à une maladie pulmonaire chez l'homme.

Les souris ont été sacrifiées afin de procéder aux lavages *in situ* des poumons avec 1mL de solution saline.

Du Substrat MeO-Succ-AAPV-Nitroxyde a été ajouté aux échantillons LBA puis inséré dans des capillaires (de diamètre interne de 2 mm, 200 µL, 125 mm, Micropipettes BLAUBRAND, Wertheim, Allemagne). Un capillaire contenant du produit à 1 mM dilué dans une solution saline a été utilisé comme référence et permettait de vérifier la stabilité du système.

La cavité RPE était réglée à la fréquence de saturation du produit (cétone) afin de suivre sa formation par OMRI. Des images avec et sans PDN ont été acquises toutes les 15 minutes, pendant 8 heures. Le facteur de rehaussement de signal a été calculé après chaque acquisition OMRI, pour chaque capillaire.

#### *Fantôme souris*

Une seringue de 50mL, en partie rempli d'un mélange huile et de solution saline. Au centre de ce fantôme, un tube (5mm de diamètre et 40 mm de longueur) contenant du

nitroxyde 4-oxo-Tempo de 5mM a été introduit. Les objectifs avec ce fantôme étaient de mimer le comportement de la souris dans la cavité RPE afin de procéder aux réglages manuels PDN et IRM et optimiser le temps entre la préparation de la souris et la première image OMRI.

### 3.4.2. Expérimentation animale

Pour toutes les expérimentations *in vivo*, des souris femelles C57BL6J (Charles River, France) âgées de 10 semaines, pesant 20 à 24g ont été utilisés et hébergées au laboratoire.

Pendant la procédure d'imagerie, elles étaient maintenues en état de sédation par un mélange anesthésiant d'isoflurane (5% dans l'air) et à une température interne de 35°C. Les souris étaient allongées sur le dos sur un lit fabriqué au laboratoire. Pour limiter les mouvements respiratoires thoraciques pendant l'acquisition et privilégier une respiration abdominale libre, le thorax était maintenu par du ruban adhésif. Un tube (5 mm de diamètre et 40 mm de longueur) rempli du nitroxyde d'intérêt était placé sur le thorax de la souris et a servi de témoin positif OMRI. Un ballonnet était posé sur l'abdomen de l'animal afin de suivre son rythme respiratoire, sans réaliser de synchronisation avec la séquence d'imagerie.

Les images de poumons de souris saines ont été obtenues après administration par voie intratrachéale de 70  $\mu$ L de nitroxyde d'intérêt.

Pour les études où l'intention était de se rapprocher de l'état inflammatoire, les souris ont été instillé par voie intra-trachéale avec du (LPS-Pa), puis instillé à nouveau au bout de 24 heures avec 70 $\mu$ L du nitroxyde choisi.

Le protocole d'instillation intratrachéale mis en place est présenté en **annexe 6.1**.

Avant chaque début d'expérience *in vivo*, le réglage de la cavité est fait avec un « fantôme souris » à la fréquence RPE, calculée à partir des équations (3.6) ou (3.7) selon le nitroxyde étudié. Cette mise au point permet d'acquérir la première image OMRI dans les 3 premières minutes après instillation.

## 4. Résultats

Cette section présente dans un premier temps une évaluation sur fantôme des séquences UTE3D et FSE3D implantées dans le nouveau système MRI-Tech opérant à 0.2T, notamment en ce qui concerne le sous-échantillonnage en présence d'effet Overhauser.

Par la suite, ces séquences sont examinées quant à leur capacité à mesurer la bio distribution de nitroxydes de différentes natures dans les poumons de souris par effet Overhauser *in vivo*.

En parallèle, l'activité enzymatique de l'élastase du neutrophile est mesurée *in vitro* par OMRI sur des échantillons-tests et sur des lavages broncho-alvéolaires de souris en situation inflammatoire.

Enfin, les expériences de détection par OMRI de l'activité enzymatique de l'élastase *in vivo* dans le poumon sont décrites.

## 4.1. Evaluation des séquences UTE3D et FSE3D

### 4.1.1. Application *in vitro*

Les acquisitions partielles de l'espace de Fourier en FSE 3D et UTE 3D ont été évaluées avec un fantôme de résolution. L'intérêt n'a été porté que sur le tube contenant le radical TXO.

#### Séquence FSE3D

La figure 27A présente une coupe axiale extraite d'une image 3D acquise en 5 minutes avec la matrice complète. Cette acquisition a été utilisée comme matrice de référence pour l'acquisition partielle. Le SNR dans le tube contenant le TXO était de 15.

Une image de basse résolution, dont le remplissage partiel de l'espace k acquis en 38 secondes et avec l'activation de l'irradiation RPE, est affichée à la figure 27B. Le SNR était de 135. L'acquisition de cette image a été répétée mais sans irradiation. Un SNR de 12 a été déterminé dans le tube. Le signal a été renforcé par un facteur 11,3 au cours de l'expérience OMRI.

Ensuite, la figure 27C présente l'image reconstruite en utilisant le concept keyhole. Cette fois, le SNR n'était que de 66. Le rehaussement apparent du signal dans le tube de nitroxyde était de 4,4.

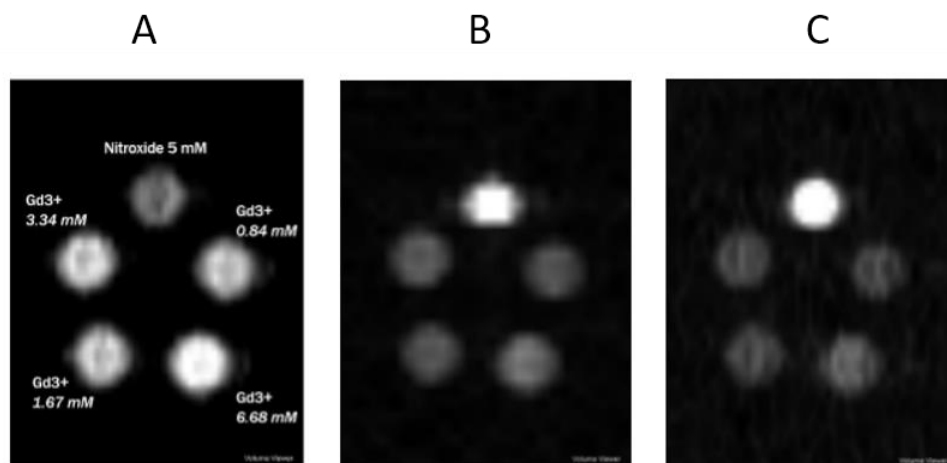


Figure 27 : Images acquises par FSE 3D

- A) Image de haute résolution (Matrice  $64 \times 32 \times 32$  et  $FOV = 64 \times 32 \times 32 \text{ mm}^3$ ) acquise sans saturation RPE
- B) Image OMRI de basse résolution acquise (Matrice  $64 \times 64 \times 64$  et  $FOV = 64 \times 64 \times 64 \text{ mm}^3$ ) acquise avec une saturation RPE
- C) Image reconstruite par keyhole

La différence de rehaussement calculée à partir des matrices partielles (11,3) et complètes (4,4), peut être expliquée par l'ajout de bruit (multiplié par 2,4) lors du redimensionnement de la matrice sous-échantillonnée avec saturation RPE avec des lignes périphériques de la matrice de référence sans saturation RPE.

### *Séquence UTE 3D*

Suivant le même principe d'acquisition d'images sous-échantillonnées en présence d'effet Overhauser, des images avec et sans saturation RPE ont été obtenues.

Le plan de Fourier sous échantillonné d'un facteur 14 (845 projections), a été acquis en 17 secondes. Les images obtenues à l'issue de ce sous échantillonnage sont affichées dans les figures 28A sans saturation RPE et 28B avec RPE. Le SNR dans le tube contenant le radical TXO était de 25,9 avec la saturation active.

L'image de la figure 28C a été acquise avec 11830 projections de façon à obtenir après-C'est l'image de référence pour réaliser le keyhole.

La figure 28D présente l'image reconstruite en utilisant le concept keyhole. Sur cette image, le tube de nitroxyde renvoyait un SNR de 13,6. La diminution du SNR entre les images sous-échantillonnée et de référence, vient essentiellement du bruit qui s'ajoute pendant le processus du keyhole. Le bruit a été multiplié par un facteur 1,8.

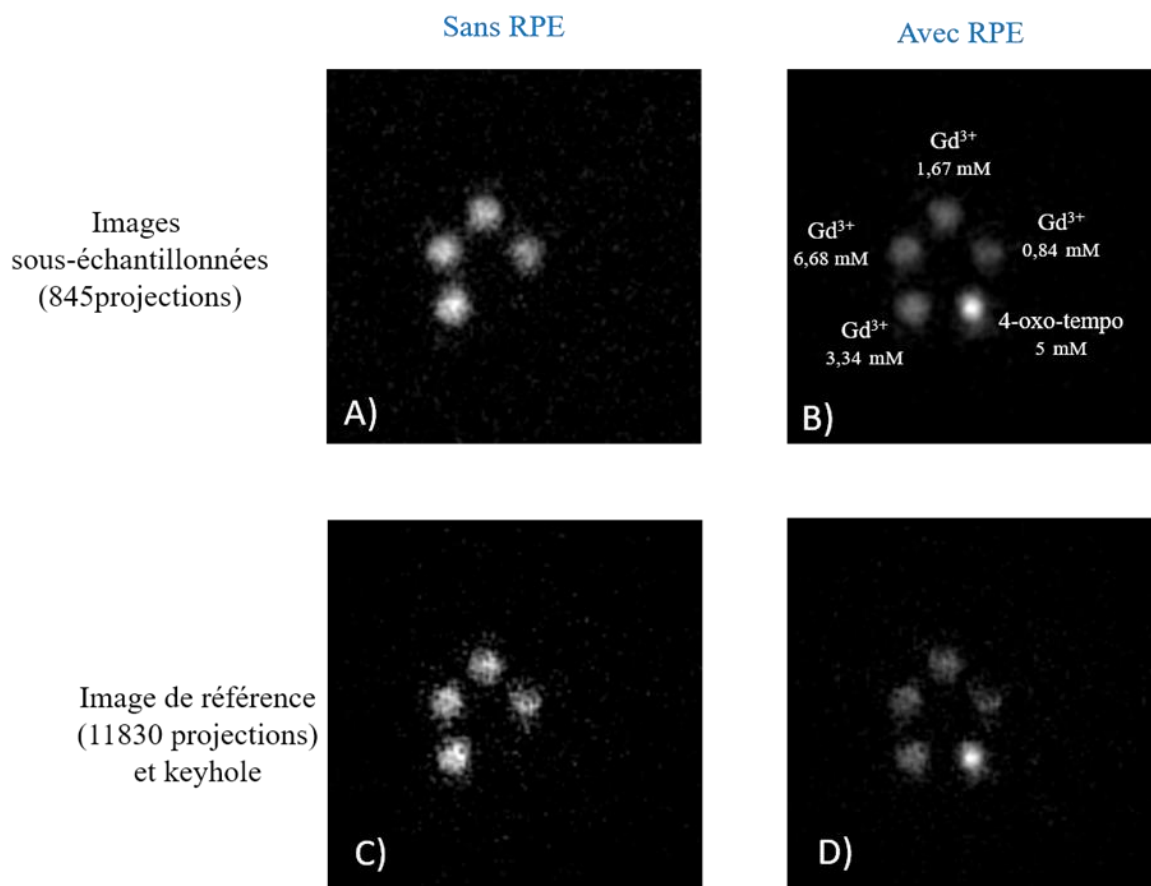


Figure 28 : Stratégie Keyhole avec effet Overhauser pour l'acquisition UTE3D. Les images sous échantillonnées ont été acquises avec 845 projections et 64 points échantillonnés par projections sans saturation RPE A) et avec saturation B). Une image de référence a été acquise avec 11830 projections et un échantillonnage de 64 points en lecture sans RPE C) et a servi à faire la reconstruction de la matrice complète D).

Le signal en provenance du tube de TXO n'était pas perceptible sur les images 3D acquises sans PDN en raison d'une saturation de l'aimantation à TR court et ne permet donc pas de calculer un facteur de rehaussement.

L'ajout de gadolinium dans le fantôme de nitroxyde n'aurait pas permis de contourner ce problème. L'effet Overhauser ne serait pas visible, parce que le facteur de fuite serait détourné par une espèce paramagnétique supplémentaire.

#### 4.1.2. Estimation des T2 et T2\* *in vivo*

Ces mesures T2 et T2\* ont été réalisées sur des poumons de souris C57/B16 saines avec les séquences FSE 3D et UTE3D, respectivement.

Les intensités du signal ont été mesurées dans les régions d'intérêt (ROI) dessinés dans les lobes pulmonaires sur des images en vue coronale. Les temps T2 et T2 \* ont été calculés comme étant l'inverse de vitesse de déclin des intensités du signal par rapport aux TE dans les ROIs à l'aide d'une fonction exponentielle :

$$S(TE) = S_0 * \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right) + C$$

Où S (TE) est l'intensité du signal au temps d'écho TE, S<sub>0</sub> est l'amplitude du signal à un TE égal à zéro et C est la ligne de base.

#### Mesure de T2 dans les poumons

La figure 29A montre deux coupes FSE 3D de poumons de souris à des temps d'écho, TE de 9 et 25 millisecondes. L'intensité de signal dans les poumons de souris a été mesurée pour des TE compris entre 9 ms et 80 ms (figure 29B). La valeur T2 moyenne des poumons de souris était de  $26,6 \pm 6,7$  ms à 0,2T.

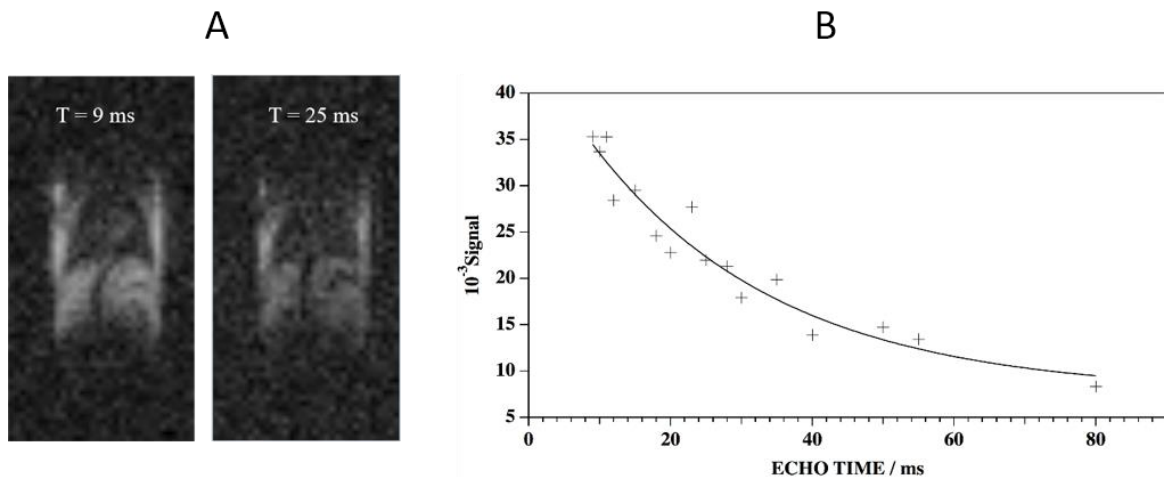


Figure 29 : Mesure du T2 dans le poumon de souris.

A) Coupes coronales des poumons de souris à TE = 9 ms et TE = 25 ms.

B) Evolution du signal moyen dans les poumons de souris en fonction du temps d'écho.

#### Mesure T2\* dans les poumons

La constante de temps T2\* dans le poumon est court d'où la grande difficulté à l'imager avec une séquence classique type écho de gradient. Des images UTE 3D ont été obtenues pour des TE compris entre 0.07 et 30ms afin de visualiser la décroissance du signal dans son intégralité. La figure 30A montre des poumons de souris à TE = 0.07 et 15 ms. La



figure 30B illustre l'évolution du signal en fonction du temps d'écho dans une coupe extraite du volume 3D. Des valeurs ont été relevées et ont permis de déterminer une valeur moyenne de  $T2^*$  dans les poumons. Un  $T2^*$  moyen de  $2.9 \pm 0.2$  ms a été mesuré.

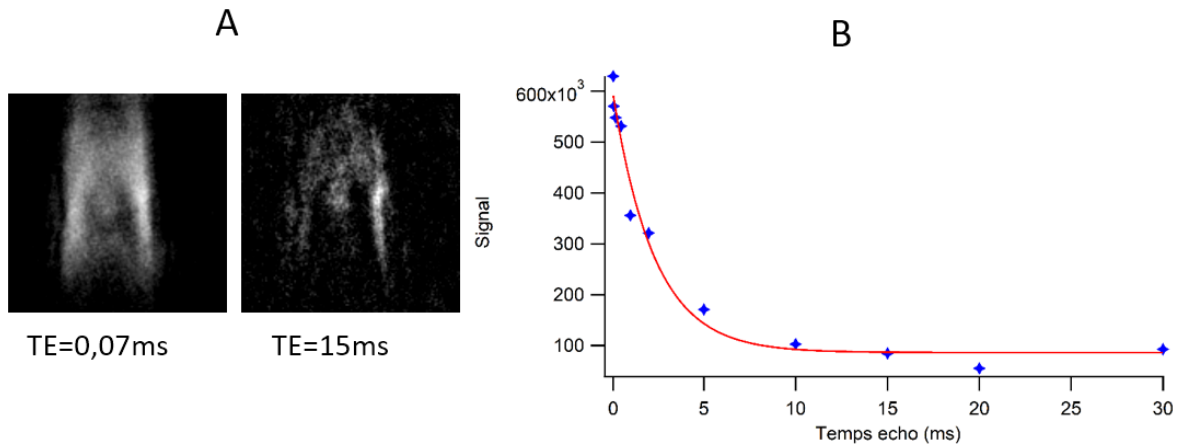


Figure 30 : Mesure du  $T2^*$  dans le poumon de souris.

A) coupe coronale des poumons de souris à  $TE = 0.07$  ms et  $TE = 15$  ms.

B) Evolution du signal moyen dans les poumons de souris en fonction du temps d'écho.

## 4.2. OMRI du poumon *in vivo*

Des souris saines ont été instillées par voie intra-trachéale avec 70  $\mu$ L de solution de nitroxyde à 25 mM. L'expérimentation a été suivie pendant environ 30 min, soit jusqu'à disparition de l'effet Overhauser (rehaussement de signal en magnitude et inversion de phase) dans les poumons. Les images ont été acquises toutes les 10 min.

### 4.2.1. OMRI avec la séquence UTE3D

Les souris ( $n = 5$ ) ont subi une instillation avec 25mM de PCA.

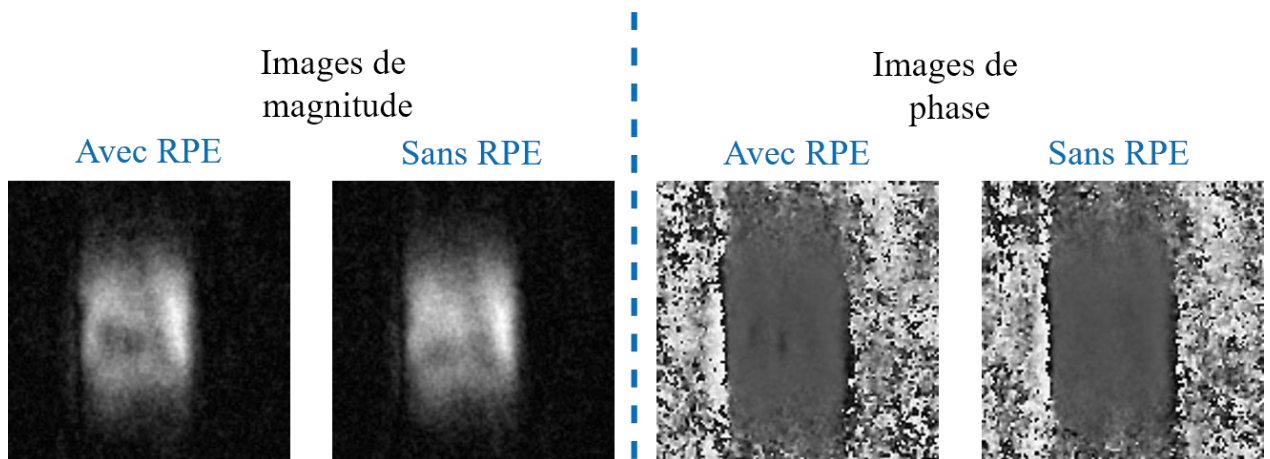


Figure 31 : Images de magnitude et de phase de poumons de souris acquises avec la séquence UTE3D sous-échantillonnée.

La figure 31 représente les images UTE3D sous échantillonnées. Les images en magnitude montrent clairement qu'il n'y pas eu de changement manifeste de signal dans les poumons, ni de changement de phase, indiquant l'absence de détection de l'effet Overhauser. Ce résultat inattendu pourrait s'expliquer par une résolution spatiale ne permettant pas de localiser des zones de petite taille où le nitroxyde serait présent. Afin de confirmer cette hypothèse, des images ont été acquises avec remplissage cartésien de l'espace de Fourier en FSE sur cette même souris.

### 4.2.2. OMRI avec la séquence FSE 3D

Les images présentées ci-dessous ont été acquises avec une séquence FSE 3D, auxquelles la méthode keyhole a été appliquée.

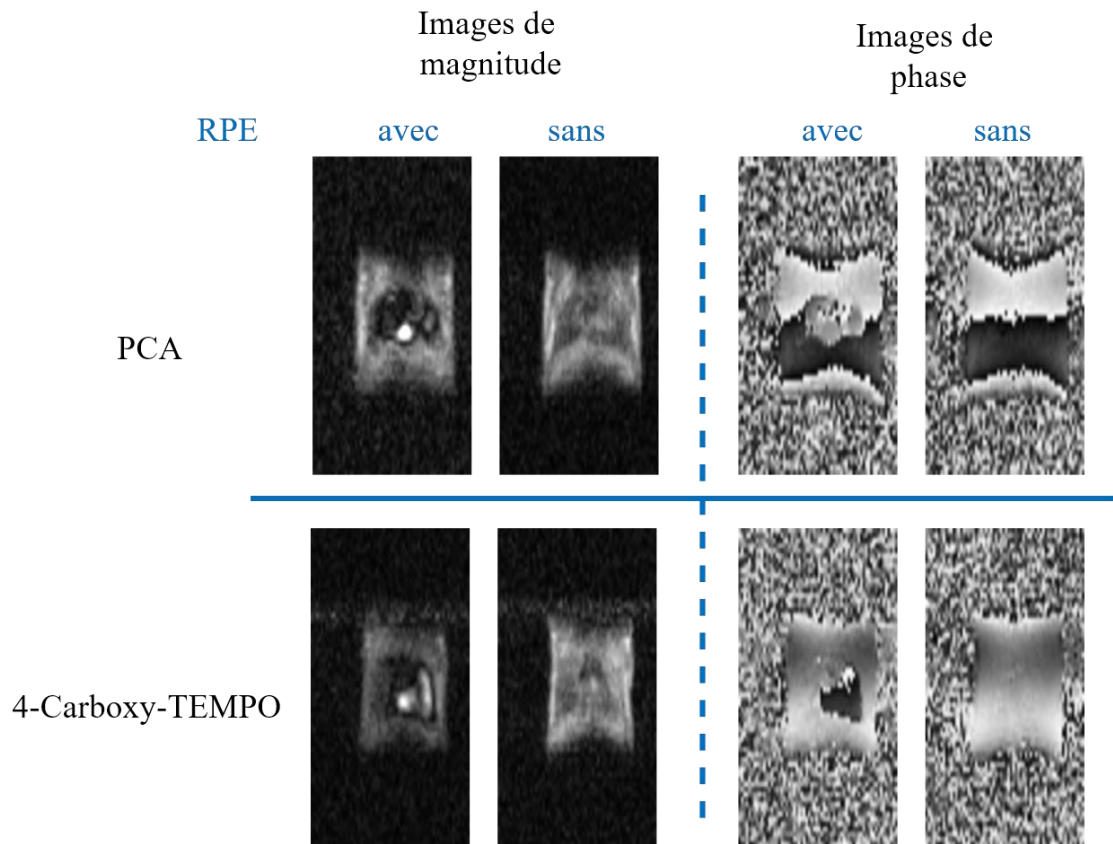
*Instillation de nitroxydes témoins*

Figure 32 : Coupes coronales de poumons de souris saines, 3 minutes après instillation de nitroxyde témoins. Les images de phase et de magnitudes sont présentées pour révéler l'effet Overhauser.

La figure 32 présente des images en magnitude où l'effet Overhauser est visible soit par une surbrillance ou des zones éteintes. Dans ces dernières l'effet se manifeste par une inversion de phase dans les poumons, correspondant à de faibles concentrations en nitroxydes. L'examen de ces images montre que les nitroxydes se sont bien répartis dans les poumons à la suite du protocole d'instillation.

Une amplification de signal d'un facteur 3 a été calculée avec le PCA et un facteur 4 avec le 4-carboxy-tempo dans les 3 première minutes après instillation.

En plus de ces agents témoins, des souris ont été instillées avec nitroxydes également vendus dans le commerce (figure 33) : 4-amino-tempo (Fischer scientifique, France), 4-oxo-tempo, TOAC (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) et SG1 (Institut de Chimie Radicalaire, Marseille, France) selon des concentrations comprises entre 7 mM et 25 mM. Des gains autour 1,2 ont été obtenus avec le TOAC à 7 mM, tandis que les autres (SG1 et

4-amino-tempo et TXO) n'ont manifesté aucun effet Overhauser significatif et ce pour n'importe quelle concentration.

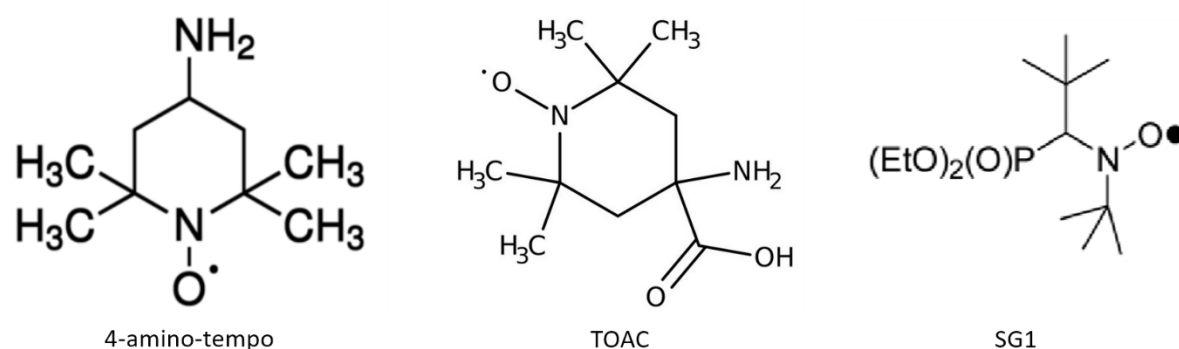


Figure 33 : Structures moléculaires des nitroxydes témoins

Le tableau 4 résume les rehaussements Overhauser mesuré pour chacun des nitroxydes à des concentrations de 7, 12,5 et 25mM.

<b>Concentrations</b>	<b>7mM</b>	<b>12,5 mM</b>	<b>25 mM</b>
PCA	<b>Pas effet</b>	<b>2,1 ± 1</b>	<b>3,7 ± 1,5</b>
4-carboxy-tempo	<b>Pas effet</b>	<b>3,4 ± 0,4</b>	<b>3,2 ± 1</b>
TOAC	<b>1,8 ± 0,3</b>	<b>1,2</b>	<b>Non mesuré</b>
4-amino-tempo	<b>Pas effet</b>		
TXO			
SG1			

Tableau 4 : Récapitulatifs des gains mesurés pour différents nitroxydes instillés à différentes concentrations.

Pour des raisons de solubilité, le TXO n'a été testé qu'à une concentration de 7mM. Le PCA et le 4-carboxy-tempo fournissent de fort rehaussement. Ils possèdent tous les deux un groupement carboxylate sur leur structure moléculaire. Cette charge négative pourrait permettre d'éviter une internalisation cellulaire rapide.

#### *Instillation du substrat de l'élastase Succ-AAPV-nitroxyde*

Pour imager le substrat, la cavité RPE a été réglée à une fréquence de saturation de 5458,7 MHz pour une fréquence RMN de 8,263 MHz, à l'aide du fantôme souris. Des souris saines (N=8) ont reçu 25mM de SuccAAPV-Nitroxyde et ont été examinées durant 30 minutes.

Comme il est possible de le voir sur la figure 34, un fort contraste est constaté 3 minutes après l'instillation intratrachéale. Le signal IRM a été rehaussé d'un facteur 1,6 dans les poumons. Au bout de 30 minutes après instillation (figure 34B), le signal est moins intense. Le gain s'élève à 0,7 avec une inversion de phase.

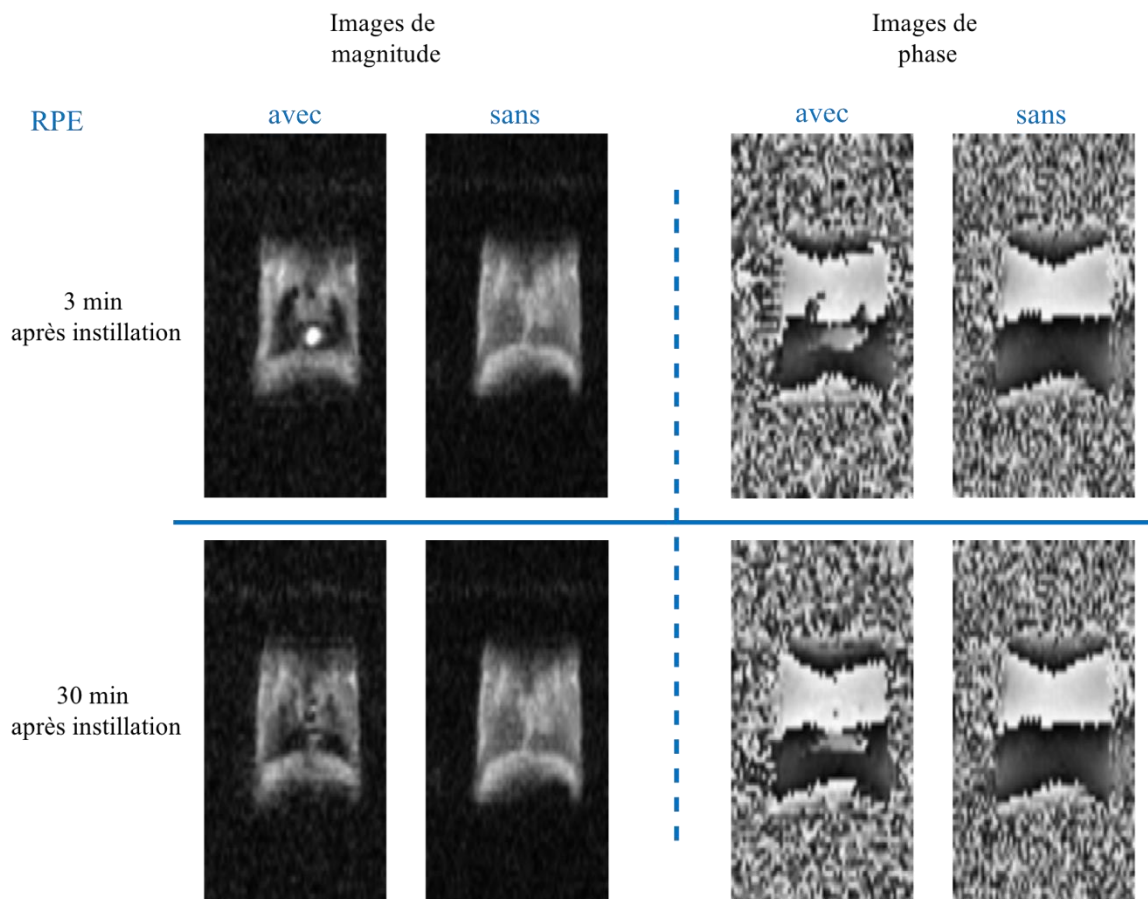


Figure 34 : Coupes coronales de poumons de souris saines, 3 et 30 minutes après instillation intratrachéale de substrat Succ-AAPV-nitroxyde à 25mM. Les images de magnitude et de phase sont présentées pour révéler l'effet Overhauser.

On constate ici un fort rehaussement net pour 25mM instillés chez la souris saine. Ce résultat est encourageant pour envisager de visualiser la biodistribution et la disparition du nitroxyde-substrat de l'élastase du neutrophile dans le poumon de souris en situation inflammatoire.

#### *Instillation du nitroxyde produit*

Pour visualiser cette fois le produit de la réaction d'hydrolyse du nitroxyde-substrat, la cavité a été accordé à la fréquence RPE de 5458,1MHz (fréquence RMN de 8.247MHz).

Les instillations ont été réalisées sur souris saines avec du produit à des concentrations comprises entre 8 et 150 mM. Les expérimentations ont été suivies pendant 20 à 30 minutes. Malheureusement aucun effet Overhauser n'a été détecté dans les poumons.

Cette absence de PDN peut résulter de plusieurs effets. Une première hypothèse est qu'une fois dans l'environnement pulmonaire, la cétone change de conformation entraînant une probable modification de la constante de couplage électron-phosphore. Pour vérifier cette hypothèse un balayage fréquentiel de 5412 à 5451 MHz avec un pas de 5 MHz (fréquence RMN de 8.24 MHz) a été réalisé. Des instillations ont été faites pour chacune de ces fréquences. Cette expérience ne s'est pas avérée concluante puisqu'aucun effet Overhauser n'a été détecté dans les poumons.

Une autre hypothèse vraisemblable est un partage du produit entre un compartiment aqueux et le surfactant alvéolaire qui est une couche lipidique, où la mobilité du nitroxyde serait fortement réduite, entraînant une saturation des spins de l'électron insuffisante ou nulle. Dans le même ordre d'idée, la molécule non chargée pourrait être très rapidement internalisée dans les cellules et métabolisée.

À ce stade, la détection du produit dans des modèles d'inflammation chez la souris semble problématique. Cependant il est possible d'envisager qu'en situation d'inflammation aiguë, la présence du nitroxyde produit par la présence d'élastase serait détectable en raison d'une forte altération tissulaire rendant possible la présence d'un compartiment aqueux dans les poumons. Alternativement, la protéolyse pourrait également être évaluée en suivant la cinétique de la disparition du substrat.

### 4.3. Mesure par effet Overhauser de l'activité protéolytique *in vitro*

#### 4.3.1. Introduction

L'imagerie de l'activité protéolytique en utilisant l'OMRI exige une mesure claire de l'effet Overhauser modulé par les changements de concentration du substrat et du produit. L'objectif ultime étant de mesurer l'activité *in vivo*, des contrôles préalables ont été effectués *in vitro* pour mesurer cette activité, d'abord sur échantillons-tests contenant l'enzyme et le nitroxyde substrat, puis sur des échantillons biologiques *ex vivo* issus de poumons de souris présentant une inflammation.

#### 4.3.2. Caractéristiques spectrales des nitroxydes substrat et produit

En amont des expériences de protéolyse du substrat catalysée par l'élastase, les fréquences optimales de saturation RPE pour ces deux molécules ont été vérifiées. Un balayage fréquentiel autour de la fréquence de saturation correspondant au quatrième pic du spectre RPE a été effectué pour le substrat puis le produit. A chaque changement de fréquence, la cavité a été ajustée et le signal OMRI résultant a été mesuré.

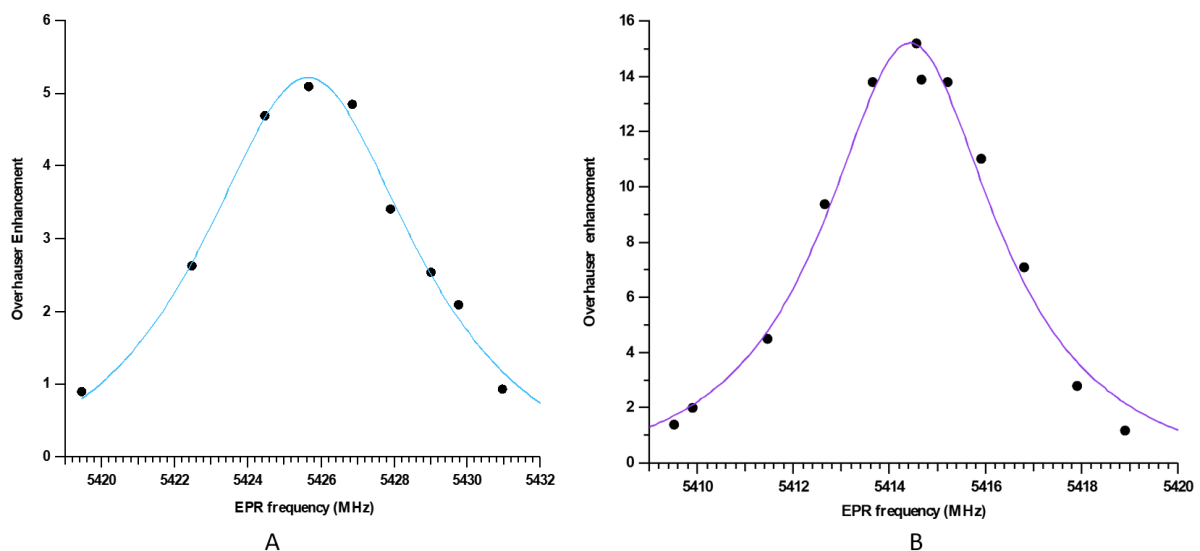


Figure 35 : Balayage fréquentiel pour la détermination des fréquences de saturation RPE optimales pour les expériences OMRI: Mesure des rehaussements du signal du substrat (A) et du produit (B) en fonction de la fréquence RPE. Le champ magnétique  $B_0$  de l'IRM était de 0,1936T pour le substrat et de 0,1935T pour le produit.

La figure 35 affiche les rehaussements Overhauser en fonction de la fréquence de saturation. Des gains maximaux de 5,1 et 15,9 ont été observés respectivement à des fréquences RPE de 5425,6 MHz pour le substrat (figure 35A) et 5414,4 MHz pour le produit (Figure 35B). La largeur à mi-hauteur des pics était de 7,4 MHz pour le substrat et 4 MHz pour le produit, ce qui semble corrélé aux largeurs de raies des spectres RPE. Cette différence entre les valeurs de largeur de raie pourrait s'expliquer par la différence de masse moléculaire de chaque forme de nitroxyde (clivée ou non).

Le substrat MeOSuccAAPV-Nitroxyde et le produit présentent des caractéristiques fréquentielles bien distinctes avec un recouvrement spectral quasi-nul. Cela permet un suivi sélectif durant la protéolyse d'une des formes de manière univoque lorsque les deux composés sont présents dans un même mélange.

#### 4.3.3. Mesure de l'activité protéolytique *in vitro*

La protéolyse du substrat MeOSuccAAPV-Nitroxyde par OMRI a été contrôlée en examinant la dégradation du substrat puis en observant la formation du produit dans des expériences séparées. Les cinétiques du substrat et du produit ont été effectuées en présence d'élastase du neutrophile à 20 nM pour la dégradation du substrat et 40 nM pour le suivi du produit. La cinétique d'hydrolyse a été déclenchée en ajoutant une concentration initiale en substrat de 1 mM (consommation de substrat) ou à 0,5 mM (formation de produit). Pour chacune des expériences, deux séries d'images 2D ont été acquises avec une séquence classique d'écho de gradient à divers intervalles de temps avec et sans saturation électronique



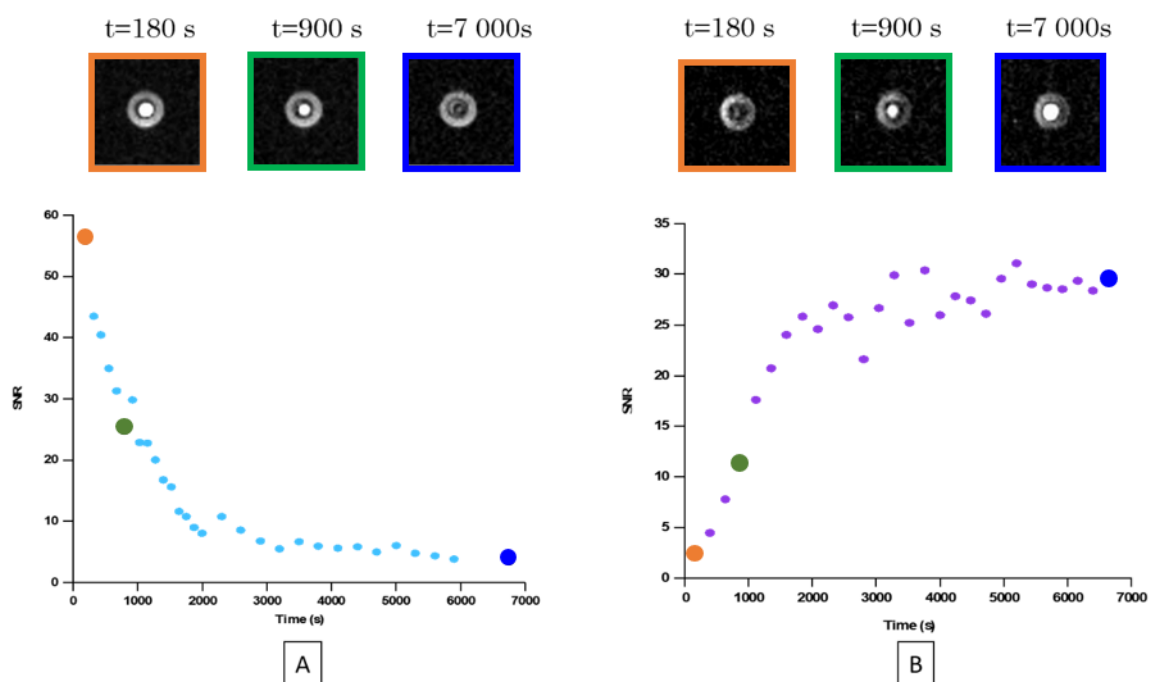


Figure 36 : Protéolyse du substrat mesurée par OMRI.

La couleur du cadre des images 2D dans la partie haute de la figure correspond aux points de même couleur des cinétiques reportées dans la partie basse.

- A) Suivi de la dégradation du substrat induite par la protéolyse de l'élastase du neutrophile au cours du temps à une fréquence RPE de 5426 MHz.
- B) Evolution temporelle de la formation du produit résultant de l'hydrolyse du substrat à une fréquence RPE de 5415 MHz.

Les cinétiques de dégradation du substrat ou d'apparition du produit ont été mesurées par OMRI. La figure 36 montre des images acquises pendant ces mesures. Un rehaussement Overhauser maximale de 5 pour le substrat a été obtenu au début de la réaction, tandis qu'une augmentation maximale de 8 pour le produit a été obtenue en fin de cinétique.

Les résultats confirment que les fréquences respectives du substrat et du produit permettent de suivre la progression du signal de façon indépendante de l'un ou de l'autre. De plus les cinétiques démontrent le caractère catalytique de la réaction, car l'hydrolyse spontanée du substrat MeOSuccAAPV-Nitroxide en l'absence d'élastase du neutrophile représente moins de 10 % de l'amplitude des changements observés avec l'enzyme (données non montrées). Ces nitroxydes semblent donc tout-à-fait indiqués pour détecter *a minima* l'activité protéolytique *in vitro* dans les LBA.

Ce travail a été publié avec succès dans Free Radical Biology & Medicine. L'article fait partie intégrante de ce manuscrit, voir la section 4.3.5.

Plus axé sur l'étude enzymatique dans les tumeurs, une autre sonde a été explorée en OMRI (**annexe 6.2**)

#### 4.3.4. Cinétique enzymatique sur des lavages broncho-alvéolaires

Des souris sauvages (WT) exprimant l'élastase du neutrophile et des souris mutantes ne l'exprimant pas (KO-NE) ont été soumises à une infection pulmonaire expérimentale par instillation de *Pseudomonas Aeruginosa*, provoquant un afflux massif de neutrophiles dans les poumons. Les lavages broncho-alvéolaires de ces modèles murins ont été réalisées par le Dr Bentaher du Centre International de Recherche en Infectiologie à Lyon.

Les activités enzymatiques de l'élastase issue des LBA ont été mesurées dans des capillaires *in vitro* par RPE et OMRI. Les LBA de souris non infectées, sauvages ou mutantes, ont également été mesurées pendant plusieurs heures. L'OMRI a été réalisée avec la fréquence RPE du produit de la réaction.

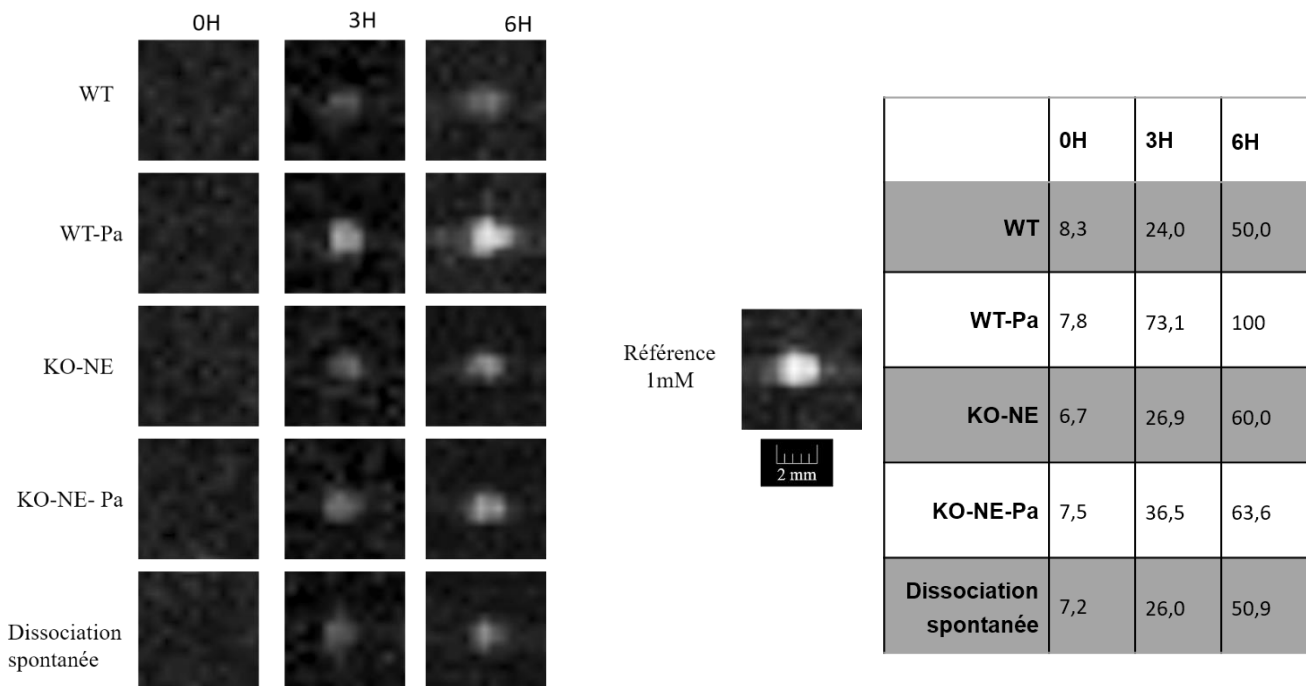


Figure 37 : Détection de la protéolyse du substrat Succ-AAPV-nitroxydes dans des capillaires contenant des LBA de souris par OMRI-2D. (Droite) Valeurs mesurées de rehaussement rapportées au rehaussement d'un échantillon de 1mM de nitroxyde-produit (en %).

WT : souris sauvage; Pa : infection par *Pseudomonas* ; KO-NE : souris n'exprimant pas l'élastase du neutrophile.

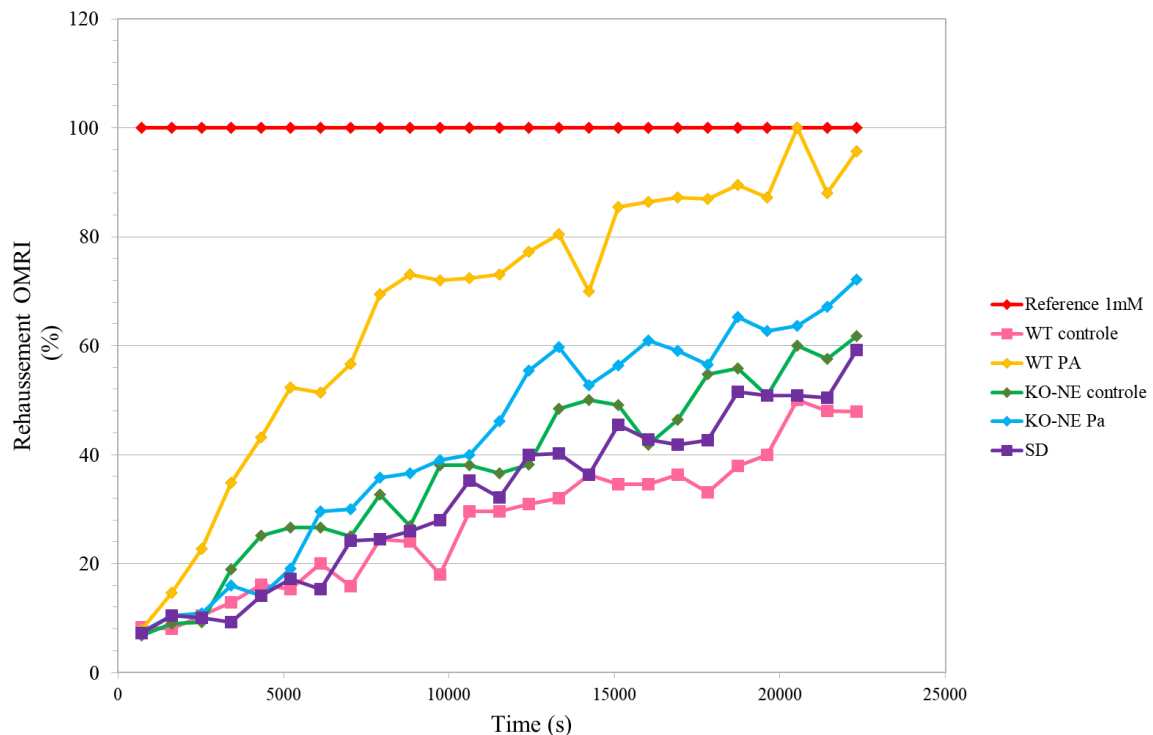


Figure 38 : Courbes représentatives des rehaussements mesurés dans les LBA de souris normalisées par rapport à un échantillon de 1 mM de nitroxyde-produit. Les symboles sont les mêmes que dans la figure 37.

Le rehaussement dû à la formation du produit dans les capillaires a été normalisé par rapport à un capillaire de référence ne contenant que du produit à 1 mM. Son rehaussement de signal est resté stable au cours de l'expérience à une valeur de  $5,3 \pm 1,2$ .

Dans chacune des conditions le rehaussement par effet Overhauser s'accroît au cours du temps. Une distinction nette ressort chez les souris WT infectées par *Pseudomonas aeruginosa* (WT-PA) par rapport aux autres conditions (figure 37). Au bout de 6 heures d'expérience, 100% de produit a été trouvé dans les LBA de souris sauvages infectées, alors que les autres LBA en présentent moins de 65%. Les courbes (figure 38) d'évolution de rehaussement en fonction du temps pour les souris, non-infectées et/ou KO pour l'élastase, suivent approximativement la même tendance que la courbe de dissociation spontanée (SD) du substrat en produit.

Ces résultats démontrent que le substrat MeOSuccAAPV-Nitroxyde permet de détecter l'élastase du neutrophile dans un échantillon biologique issu de souris présentant un état inflammatoire. Ces résultats consolident nos attentes pour l'imagerie moléculaire *in vivo*.

4.3.5. Article



Contents lists available at ScienceDirect

## Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/freeradbiomed](http://www.elsevier.com/locate/freeradbiomed)

Original article

## An elastase activity reporter for Electronic Paramagnetic Resonance (EPR) and Overhauser-enhanced Magnetic Resonance Imaging (OMRI) as a line-shifting nitroxide



Natacha Jugniot<sup>a,1</sup>, Indranil Duttgupta<sup>b,1</sup>, Angélique Rivot<sup>a</sup>, Philippe Massot<sup>a</sup>, Colleen Cardiet<sup>a</sup>, Anne Pizzoccaro<sup>c</sup>, Marion Jean<sup>d</sup>, Nicolas Vanthuynne<sup>d</sup>, Jean-Michel Franconi<sup>a</sup>, Pierre Voisin<sup>a</sup>, Gilles Devouassoux<sup>c</sup>, Elodie Parzy<sup>a</sup>, Eric Thiaudiere<sup>a</sup>, Sylvain R.A. Marque<sup>b,e</sup>, Abderrazzak Bentaher<sup>c</sup>, Gérard Audran<sup>b</sup>, Philippe Mellet<sup>a,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR5536, CNRS, Université de Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France

<sup>b</sup> Aix Marseille Univ., CNRS, ICR, UMR 7273, case 551, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille Cedex 20, France

<sup>c</sup> Equipe "Inflammation et Immunité de l'Épithélium Respiratoire" - EA7426 Faculté de Médecine Lyon Sud, 165, Chemin du Grand Revoynet, 69495 Pierre Bénite, France

<sup>d</sup> Aix Marseille Univ., CNRS, Centrale Marseille, iSm2, Marseille, France

<sup>e</sup> Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Pr. Lavrentjeva 9, 630090 Novosibirsk, Russia

<sup>f</sup> INSERM, 33076 Bordeaux Cedex, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Nitroxide  
EPR  
Protease  
OMRI  
Peptide  
Molecular imaging  
Inflammation

## ABSTRACT

Pulmonary inflammatory diseases are a major burden worldwide. They have in common an influx of neutrophils. Neutrophils secrete unchecked proteases at inflammation sites consequently leading to a protease/inhibitor imbalance. Among these proteases, neutrophil elastase is responsible for the degradation of the lung structure via elastin fragmentation. Therefore, monitoring the protease/inhibitor status in lungs non-invasively would be an important diagnostic tool.

Herein we present the synthesis of a MeO-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-nitroxide, a line-shifting elastase activity probe suitable for Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy (EPR) and Overhauser-enhanced Magnetic Resonance Imaging (OMRI). It is a fast and sensitive neutrophil elastase substrate with  $K_m = 15 \pm 2.9 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat}/K_m = 930,000 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  and  $K_m = 25 \pm 5.4 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat}/K_m = 640,000 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  for the R and S isomers, respectively. These properties are suitable to detect accurately concentrations of neutrophil elastase as low as 1 nM. The substrate was assessed with broncho-alveolar lavages samples derived from a mouse model of *Pseudomonas pneumonia*. Using EPR spectroscopy we observed a clear-cut difference between wild type animals and animals deficient in neutrophil elastase or deprived of neutrophil Elastase, Cathepsin G and Proteinase 3 or non-infected animals.

These results provide new preclinical *ex vivo* and *in vivo* diagnostic methods. They can lead to clinical methods to promote in time lung protection.

## 1. Introduction

Pulmonary inflammatory diseases represent a major health concern worldwide as well as an economic burden. They include asthma, cystic fibrosis (CF), chronic obstructive pulmonary disorder (COPD) (e.g., emphysema), acute respiratory distress syndrome and alpha-1-antitrypsin deficiency. For instance, COPD alone concerns a population estimated to 175 million people and accounts for 3.2 million deaths

ranking it to the fifth cause of mortality worldwide [1]. Among the precipitating factors for disease development are tobacco smoking, urban air pollution and wood fire smoke. A common denominator of pulmonary inflammatory diseases is the high neutrophil influx as seen in CF or during the exacerbation phase of COPD. At inflammation sites, neutrophils discharge four serine proteases into the extracellular environment whose concentrations surpass that of their corresponding physiologic inhibitors resulting in protease/anti-protease imbalance

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [eric.thiaudiere@rmsb.u-bordeaux.fr](mailto:eric.thiaudiere@rmsb.u-bordeaux.fr) (E. Thiaudiere), [sylvain.marque@univ-amu.fr](mailto:sylvain.marque@univ-amu.fr) (S.R.A. Marque), [azzak.bentaher@inserm.fr](mailto:azzak.bentaher@inserm.fr) (A. Bentaher), [g.audran@univ-amu.fr](mailto:g.audran@univ-amu.fr) (G. Audran), [philippe.mellet@rmsb.u-bordeaux.fr](mailto:philippe.mellet@rmsb.u-bordeaux.fr) (P. Mellet).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.006>

Received 2 May 2018; Received in revised form 1 August 2018; Accepted 3 August 2018

Available online 06 August 2018

0891-5849/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

causing tissue damage, hence progressive loss of lung functions.

Neutrophil elastase (NE), a potent protease, was shown to be the main tissue-destructive actor because of its large repertoire of substrate including structural proteins particularly elastin [2,3], a major lung structural protein, although the four neutrophil proteases can act synergistically [4].

Therapeutically, lungs protection needs an adapted treatment with protease inhibitors. However, preclinical research to setup such protocols is impaired by the absence of a reliable imaging method to localize deleterious enzyme activities in order to assess the actual protease/antiprotease balance status before and after treatment. Ultimately, an elastase activity imaging method valid for humans would detect lung inflammation long before any irreversible tissue damage could occur. Thus a treatment with inhibitors [5] or a change in habits could be proposed “in time” to save the lungs.

Molecular imaging of the proteolytic activity is most easily done using internally quenched fluorescent substrates. These substrates have good enzymatic constants because they can encompass both the P and P' regions in the Schechter and Berger nomenclature [6]. There are however several drawbacks of this method: substrate fluorescence quenching is not complete thus causing long waiting times to eliminate nonspecific “blinding” light, light tissue penetration is limited and prevents imaging of deeply seated tissues or skull and three-dimensional images are obtained by reconstruction.

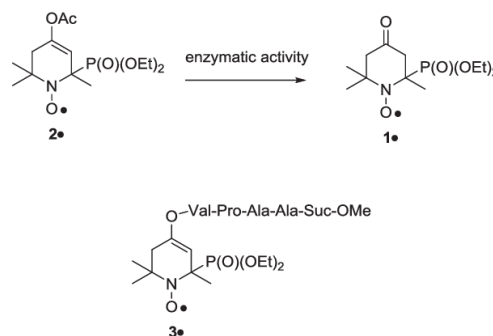
Magnetic Resonance Imaging (MRI) methods have a superior true 3D space encoding and use wavelengths that only weakly interfere with tissues. Electronic Paramagnetic Resonance (EPR) is a sensitive free radical detection method suitable in visible light-opaque media. Stable free radicals such as nitroxides or trityls can be detected or imaged *in vitro* and *in vivo*. Since unpaired electrons are particularly sensitive to the electronic environment some have been designed to display resonance line broadening or shifting to detect various parameters. Hence free radicals have been used for oximetry [7,8], redox status imaging [9,10], pH measurement [11–14], water content measurement [15] or to report on enzymatic activity [16–18]. EPR imaging (EPRI) can be used with these free radicals. Unfortunately, due to the very fast relaxation of free electrons EPRI still remains slow and insufficiently resolved. Magnetic Resonance Imaging (MRI) is the method of choice to deliver exquisite anatomical details but its low sensitivity so far prevented molecular imaging such as enzyme activity imaging. Interestingly, a line shifting substrate can also be monitored by Overhauser-enhanced Magnetic Resonance Imaging (OMRI). OMRI is an emerging imaging method designed to enhance NMR sensitivity. It is a double resonance experiment transferring a part of the higher spin polarization of an unpaired electron to the environing water protons (through the electron-proton Overhauser effect) which enhances the MRI signal that appears brighter [19].

It has been shown recently that OMRI at 0.2 T was able to reveal brain tumors in mice models of glioma through intravenous injection of a nonspecific nitroxide with high contrast on three-dimensional images [20]. Moreover, a nonspecific prototype of the line-shifting nitroxide later described in this study was able to reveal stomach and intestinal enzymatic activity [18] (see reaction in Scheme 1). Both studies showed that high contrast and high resolution images are possible in mice with short recording times.

In this paper the synthesis of MeO-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-nitroxide (molecule 3• in Scheme 1), the first of a new family of dedicated protease substrates based on line-shifting nitroxides is reported. Its catalytic properties with neutrophil elastase and various enzymes were studied using EPR spectroscopy.

The substrate was probed in broncho-alveolar lavages from a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection with wild type and several mice knocked-out for neutrophil serine proteases.

It is also shown that this substrate is suitable for Overhauser-enhanced Magnetic Resonance Imaging.



**Scheme 1.** Enzymatic activity on enol acetate 2• releasing 1•. Elastase targeting substrate 3•.

## 2. Material and methods

### 2.1. Organic synthesis

#### 2.1.1. General remarks

<sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded using an internal deuterium lock at ambient temperatures on the following instruments: Bruker AC 400 (400 MHz) and Bruker AC 300 (300 MHz). Data are presented as follows: chemical shift (in ppm), integration, multiplicity (*s* = singlet, *d* = doublet, *t* = triplet, *m* = multiplet, *br* = broad, *dd* = doublet of doublets), coupling constant (*J* in Hz) and integration. <sup>31</sup>P NMR spectra were recorded on a Bruker AC 300 (122 MHz) and on a Bruker AC 400 (162 MHz) spectrometers with complete proton decoupling. Chemical shifts ( $\delta$ ) were reported in ppm using TMS as internal reference for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra, and 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> for <sup>31</sup>P NMR spectra. High-resolution mass spectra (HRMS) were performed on a SYNAPT G2 HDMS (Waters) spectrometer equipped with atmospheric pressure ionization source (API) pneumatically assisted. Samples were ionized by positive electrospray mode as follows: electrospray tension (ISV): 2800 V; opening tension (OR): 20 V; nebulization gas pressure (nitrogen): 800 L/h. Low resolution mass spectra were recorded on ion trap AB SCIEX 3200 QTRAP equipped with an electrospray source. The parent ion ( $M^+$ ,  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  or  $[M+NH_4]^+$ ) is quoted. Analytical thin layer chromatographies (TLC) were carried out on Merck Kieselgel 60 F254 plates. Flash column chromatographies were carried out on Merck Kieselgel 60 (230–400 mesh). Solvent system: gradients of DCM/MeOH; EtOAc/EtOH. All experiments were performed under anhydrous conditions and an inert atmosphere of argon and, except where stated, using dried apparatus and employing standard techniques for handling air-sensitive materials. For EPR measurements, samples with 0.5 mM concentration of nitroxide were prepared in non-degassed solvents. Experiments were performed indifferently on Eleksys, EMX or ER 100D Bruker machines (a difference smaller than 0.1 G was noticed). EPR spectra were recorded with a gain of 2 105 (72 dB for Eleksys), a modulation amplitude of 1.0 G, a sweep width of 150 G, a sweep time of 21 s, and a power of 20 mW.

#### 2.1.2. (9H-fluoren-9-yl)methyl-(S)-2-(((S)-1-(benzyloxy)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate (2)

DIPEA (2 mL, 11.5 mmol) was added dropwise to a stirred suspension of L-Val-OBn·HCl (2.8 g, 11.5 mmol) in dichloromethane (30 mL) at room temperature under an atmosphere of nitrogen. On dissolution, the solution was cooled to 0 °C and Fmoc-L-Pro (4.26 g, 12.6 mmol) and 1-hydroxybenzotriazole (1.86 g, 13.8 mmol) were added successively, each in one portion. The suspension was stirred at 0 °C for a further 15 min, and then DCC (2.85 g, 13.8 mmol) was added in one portion. The mixture was allowed to warm to room temperature over the course



of 18 h and then filtered, and the filtrate was evaporated in vacuo. The residue was taken up in ethyl acetate and filtered, and the filtrate was then washed with 10% aqueous citric acid solution followed by saturated aqueous sodium bicarbonate solution. The combined organic layers were dried and evaporated in vacuo to afford the crude product which was purified by chromatography on silica using 3:2 petroleum ether–EtOAc as eluent to yield the protected dipeptide **2** (5.94 g, 11.28 mmol) as a light yellow solid (98%).  $[\alpha]_D^{20} - 50$  (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.68 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.48 (s, 2H), 7.33–7.17 (m, 9.7H), 6.43 (br s, 0.3H), 5.20–4.82 (br m, 2H), 4.48–4.16 (m, 5H), 3.48–3.38 (m, 2H), 2.27–1.86 (m, 5H), 0.80 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 0.75 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.2, 171.6, 156.1, 155.2, 143.8, 141.3, 135.5, 128.6, 128.4, 128.3, 127.8, 127.1, 125.1, 120.0, 67.8, 67.0, 61.2, 60.4, 57.3, 56.7, 53.5, 47.6, 47.2, 47.0, 33.9, 31.5, 31.2, 28.2, 24.7, 23.7, 19.1, 17.6. HRMS (ESI) calc for C<sub>32</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>: 527.2540 [M + H]<sup>+</sup>; found: 527.2547.

#### 2.1.3. ((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl-L-prolyl-L-valine (**3**)

To a solution of **2** (5.94 g, 11.28 mmol) in MeOH (80 mL) was added 10% Pd/C (600 mg), and the mixture was stirred for 10 h in hydrogen atmosphere (1 atm). The reaction mixture was filtered through Celite, and MeOH removed in vacuo to afford the fmoc protected dipeptide **3** in quantitative yield (4.92 g, 11.27 mmol).  $[\alpha]_D^{20} - 46.1$  (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.65–7.12 (m, 8.7H), 6.52 (br s, 0.3H), 4.15–4.38 (br m, 5H), 3.41 (br m, 2H), 2.20–1.83 (m, 5H), 0.84–0.78 (m, 6H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.7, 172.1156.1, 155.6, 149.0, 143.9, 143.7, 141.3, 140.5, 127.7, 127.1, 126.9, 125.1, 124.0, 120.0, 119.8, 68.2, 67.9, 61.0, 60.4, 57.2, 56.7, 53.5, 47.5, 47.1, 42.4, 31.2, 31.0, 28.5, 24.6, 23.5, 19.1, 17.5. HRMS (ESI) calc for C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>: 437.2071 [M + H]<sup>+</sup>; found: 437.2073.

#### 2.1.4. (S)-2-((S)-1-((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)pyrrolidine-2-carboxamido)-3-methyl-butanoic pivalic anhydride (**4**)

To an ice cold solution of dipeptide **3** (1.23 g, 2.83 mmol) in 3 mL dry dichloromethane, Pivaloyl chloride (0.7 mL, 5.7 mmol) was added followed by the dropwise addition of triethyl amine (0.6 mL, 4.3 mmol). The reaction mixture was then allowed to stir at 0 °C for 1 h (TLC shows completion of reaction) after which excess dichloromethane was removed and the residue was taken up in diethyl ether. The solution was then filtered through a celite bed. Removal of diethyl ether in vacuo yielded the targeted anhydride **4** as a white foamy solid in a quantitative yield which was used in the next reaction without any further purification.

#### 2.1.5. Methyl (S)-4-((1-(benzyloxy)-1-oxopropan-2-yl)amino)-4-oxobutanoate (**6**)

DIPEA (17 mL, 17 mmol) was added dropwise to a stirred suspension of L-Ala-OBn-HCl (6.02 g, 27.9 mmol) in dichloromethane (70 mL) at room temperature under an atmosphere of nitrogen. On dissolution, the solution was cooled to 0 °C and succinic acid monomethyl ester (4.05 g, 30.7 mmol) and 1-hydroxybenzotriazole (4.52 g, 33.48 mmol) were added successively, each in one portion. The suspension was stirred at 0 °C for a further 15 min, and then DCC (6.91 g, 33.48 mmol) was added in one portion. The mixture was warmed to room temperature in 18 h and then filtered, and the filtrate was evaporated in vacuo. The residue was taken up in ethyl acetate and filtered, and the filtrate was then washed with 10% aqueous citric acid solution followed by saturated aqueous sodium bicarbonate solution. The combined organic layers were dried and evaporated in vacuo to afford the crude product which was purified by chromatography on silica using 3:2 petroleum ether–EtOAc as eluent to yield **6** (7.2 g, 24.55 mmol, 88%) as a white solid.  $[\alpha]_D^{20} - 4.3$  (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.30–7.20 (m, 5H), 6.36 (s, 1H), 5.08 (dd, *J* = 18, 12 Hz, 2H), 4.54 (p, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.58 (s, 1H), 2.66–2.54 (m, 2H), 2.50–2.4 (m, 2H), 1.32 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.3, 172.9, 171.0, 135.4, 128.6, 128.4, 128.1, 67.1, 51.8, 48.2, 30.8, 29.2, 18.3. HRMS

(ESI) calc for C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>5</sub><sup>+</sup>: 294.1336 [M + H]<sup>+</sup>; found: 294.1340.

#### 2.1.6. Methyl 4-(((S)-1-(((S)-1-(benzyloxy)-1-oxopropan-2-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)amino)-4-oxobutanoate (**7**)

To a solution of **6** (7 g, 23.86 mmol) in MeOH (80 mL) was added 10% Pd/C (700 mg), and the mixture was stirred for 10 h in hydrogen atmosphere (1 atm). The reaction mixture was filtered through Celite followed by MeOH removal in vacuo to yield quantitatively the free acid (4.85 g, 23.8 mmol).

DIPEA (14.9 mL, 83.52 mmol) was added dropwise to a stirred suspension of L-Ala-OBn-HCl (6.16 g, 28.56 mmol) in dichloromethane (100 mL) at room temperature under an atmosphere of nitrogen. On dissolution, the solution was cooled to 0 °C and the acid obtained in the previous step (4.85 g, 23.8 mmol) and 1-hydroxybenzotriazole (3.86 g, 28.56 mmol) were added successively, each in one portion. The suspension was stirred at 0 °C for a further 15 min, and then DCC (5.89 g, 28.56 mmol) was added in one portion. The mixture was warmed to room temperature in 18 h and then filtered, and the filtrate was evaporated in vacuo. The residue was taken up in ethyl acetate and filtered, and the filtrate was then washed with 10% aqueous citric acid solution followed by saturated aqueous sodium bicarbonate solution. The combined organic layers were dried and evaporated in vacuo to leave the crude product which was purified by chromatography on silica using 3:2 petroleum ether–EtOAc as eluent to afford **7** (7.5 g, 20.71 mmol) as a white solid in 87% yield.  $[\alpha]_D^{20} - 44$  (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.25 (s, 5H), 7.10 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 5.07 (dd, *J* = 18, 12 Hz, 2H), 4.58–4.42 (m, 2H), 3.55 (s, 3H), 2.57 (dd, *J* = 10.0, 4.0 Hz, 2H), 2.41 (dd, *J* = 10.4, 4.5 Hz, 2H), 1.32 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.27 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.4, 172.4, 172.2, 171.3, 135.5, 128.6, 128.4, 128.1, 67.0, 51.8, 48.8, 48.2, 30.8, 29.2, 18.4, 17.8. HRMS (ESI) calc for C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>: 365.1707 [M + H]<sup>+</sup>; found: 365.1696.

#### 2.1.7. Methyl-4-(((S)-1-(((S)-1-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-1-oxopropan-2-yl)amino)-1-oxo-propan-2-yl)amino)-4-oxobutanoate (**8**)

To a solution of **7** (7.5 g, 20.71 mmol) in MeOH (80 mL) was added 10% Pd/C (750 mg), and the mixture was stirred for 10 h in hydrogen atmosphere (1 atm). The reaction mixture was filtered through celite followed by MeOH removal in vacuo to yield quantitatively the free acid (5.68 g, 20.71 mmol).  $[\alpha]_D^{20} + 8.7$  (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD) δ 4.39 (qd, *J* = 7.1, 3.1 Hz, 2H), 3.66 (s, 3H), 2.64 (dd, *J* = 10.1, 4.0 Hz, 2H), 2.52 (dd, *J* = 10.3, 4.0 Hz, 2H), 1.41 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.35 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD) δ 175.7, 174.9, 174.7, 174.0, 52.2, 50.1, 49.2, 31.2, 30.0, 18.0, 17.6. HRMS (ESI) calc for C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>: 275.1238 [M + H]<sup>+</sup>; found: 275.1237.

To a solution of the free acid from above (484 mg, 1.76 mmol) and N-Hydroxysuccinimide (203 mg, 1.76 mmol) in 7 mL THF, DCC (364 mg, 1.76 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature for 18 h and then filtered, and the filtrate was evaporated in vacuo to afford the NHS ester **8** as a white solid in quantitative yield (650 mg, 1.75 mmol) which was used in the next reaction without further purification. HRMS (ESI) calc for C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>: 372.1401 [M + H]<sup>+</sup>; found: 372.1400.

#### 2.1.8. Synthesis of R-4

A solution of ketone R-1• (209 mg, 0.71 mmol) in dry THF (10 mL) was slowly added to solution of LiHMDS (1.0 M solution in THF, 1.2 mL, 1.21 mmol, 1.70 equiv.) at 78 °C in dry THF (5 mL). The mixture was stirred for 3 h from –78 °C to –45 °C. Then, **4** (739 mg, 1.42 mmol, 2 equiv.) was slowly added as a cold (–45 °C) solution in 10 mL THF. The mixture was stirred for 2.5 h, then it was poured quenched with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution and extracted with EtOAc. The combined organic extracts were dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under vacuo. Column chromatography of the residue gave starting material R-1• (92 mg, 0.31 mmol) and the targeted product R-4

(175 mg, 0.25 mmol, 65% based on recovered starting material) as a red foamy solid. HRMS (ESI) calc for  $C_{36}H_{42}N_2O_8PNa^+$ : 728.3545 [M + Na]<sup>+</sup>; found: 728.3553,  $[\alpha]_D^{20}$  – 58.3 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>). EPR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): a<sub>N</sub> 14.9 G, a<sub>p</sub> 39.0 G.

#### 2.1.9. Synthesis of S-4•

S-4• was prepared following the same procedure as that for R-4•. Yield 229 mg, 0.32 mmol, 91% based on recovered starting material as a red foamy solid from S-1• (208 mg, 0.71 mmol), recovered starting material S-1• 105 mg, 0.36 mmol. HRMS (ESI) calc for  $C_{36}H_{42}N_2O_8PNa^+$ : 728.3545 [M + Na]<sup>+</sup>; found: 728.3553,  $[\alpha]_D^{20}$  – 21.3 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>). EPR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): a<sub>N</sub> 15.2 G, a<sub>p</sub> 39.10 G.

#### 2.1.10. Synthesis of R-5•

To a solution of R-4• (275 mg, 0.39 mmol) in 20 mL DCM at 0 °C, DBU (69 µL, 0.46 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 3 h (TLC showed completion of reaction) followed by column purification to yield the deprotected R-4• in 74% yield (143 mg, 0.29 mmol).

Deprotected R-4• (143 mg, 0.29 mmol) and **8** (120 mg, 0.32 mmol) was dissolved in 5 mL anhydrous DMF and the mixture was allowed to stir for 18 h at room temperature. Removal of DMF *in vacuo* followed by column chromatography yielded R-5• in 34% overall yield (105 mg, 0.14 mmol). HRMS (ESI) calc for  $C_{33}H_{36}N_5O_{12}P^+$ : 745.3658 [M + H]<sup>+</sup>; found: 745.3662. EPR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): a<sub>N</sub> 15.0 G, a<sub>p</sub> 38.9 G.

#### 2.1.11. Synthesis of S-5•

Similar procedure as that of above was used for the synthesis of R-5•, from S-4• (186 mg, 0.26 mmol) yielded the final product S-2• in 50% overall yield (52 mg, 0.07 mmol). HRMS (ESI) calc for  $C_{33}H_{36}N_5O_{12}P^+$ : 745.3658 [M + H]<sup>+</sup>; found: 745.3659. EPR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): a<sub>N</sub> 15.0 G, a<sub>p</sub> 39.0 G.

### 2.2. Enzymes

Neutrophil Elastase, Porcine Pancreatic Elastase, Proteinase 3 and Cathepsin G were purchased from Elastin Products Company (Missouri, USA). Bovine chymotrypsin and trypsin-TPCK treated were from Worthington (New Jersey, USA). Matrix Metallo Proteinases -2, -7 and -9 were purchased from Calbiochem. Stock enzyme solutions were prepared at about 10<sup>-5</sup> M in buffer HEPES 50 mM, 0.15 M NaCl, pH 5, stored at – 20 °C and later titrated as described under. All experiments were done in HEPES buffer 50 mM pH 7.4, 0.15 M NaCl and IGEPAL 0.05%.

#### 2.2.1. Enzymes titration

Enzyme's active sites in solution were quantified by spectrophotometric titration using synthetic chromogenic reagents which combined stoichiometrically with active sites (1:1). Chromogenic reagents: Succinyl-Ala-Ala-pro-phe-p-nitroanilide (Cathepsin G, chymotrypsin), MeO-succinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilide (NE, Proteinase 3) (Elastin Products Company, USA), z-Phe-Arg-p-nitroanilide (trypsin-TPCK) and Succinyl-Ala-Ala-p-nitroanilide (PPE) (BACHEM, Switzerland) were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). Trasylol from bovine lung, trypsin inhibitor from soybean (SIGMA) and Eglin C from leech (gift from Dr. H. P. Schnebli, Ciba-Geigy, Basel, Switzerland), natural protease inhibitors, were dissolved in HEPES buffer. Titrations of NE, PPE, proteinase 3 and cathepsin G were made with Eglin C, titrations of chymotrypsin and trypsin-TPCK were made with trasylol and trypsin inhibitor from soybean respectively. Activity of inhibitors was assumed to be 100%. MMP-2,-7,-9 were all active on the fluorescent substrate Dnp-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-D-Arg-NH<sub>2</sub> (Bachem). Their concentration was inferred from the manufacturer specifications.

### 2.3. EPR spectroscopy of peptide-nitroxide substrates

All samples were loaded in 75 µL (75 mm) capillaries (BLAUBRAND micropipettes.). Acquisitions were performed at 25 °C with a temperature controller (BIO-I, NOXYGEN, Germany) fitted to an EMXnano EPR spectrometer (BRUKER, Germany), under the control of Xenon software (BRUKER). Quantitation of substrate and product nitroxides at each time of the kinetics was done by fitting with both reference spectra using the Spinfit module of Xenon software. Substrate and product concentrations were obtained using the included Spincount calibrated module.

Enzymatic activity assays were carried out using the EPR spectroscopy to monitor the substrate hydrolysis.

#### 2.3.1. Enzymatic specificity screening *in vitro*

A list of proteases, described in Enzymes section, with various specificities and origins was tested in pursuit of an effective proteolytic activity on the nitroxide. All experiments were done with 1 nM proteases. Enzymatic reactions were initiated by adding a small volume of substrate 25 µM. Kinetics was immediately recorded by EPR during 2 h. EPR acquisition parameters were set as follows: Bo = 3423 G, sweep width = 120 G; sweep time = 10 s, attenuation = 6 dB; delay between scan = 30 s; modulation amplitude = 1 G; gain = 50 dB. Post processing was done with IGOR Pro (Wavemetrics, Lake-Oswego, OR, USA), initial velocities from different enzymes were collected and compared in a histogram.

#### 2.3.2. Michaelis kinetics constants of NE with both peptide-nitroxide isomers

Kinetic reactions were made with NE 1 nM by adding a range of 11 concentrations of substrate from 2.5 µM to 200 µM, prepared contemporaneously to limit spontaneous hydrolysis. EPR acquisition parameters were set as follows: Bo = 3423 G, sweep width = 120 G; sweep time = 10 s, attenuation = 6 dB; delay between scan = 30 s; modulation amplitude = 4 G; gain = 50 dB. Thus spectra were recorded at 10 s interval. Quantitation of substrate and product nitroxides at each time of the kinetics was done by fitting with both reference spectra using the Spinfit module of Xenon software. Substrate and product concentrations were calculated using the included Spincount calibrated module. Product concentrations were plotted as a function of time. Initial velocities were extracted by linear regression on the linear portion of the plot (less than 5% of substrate consumed) for each initial substrate concentration. Initial velocities values were finally plotted versus substrate concentration. Michaelis-Menten hyperbolic representation was built from the initial velocities and a nonlinear regression analysis was performed using Michaelis-Menten equation:  $V_0 = \frac{k_{cat} \times [E_0] \times [S_0]}{K_m + [S_0]}$ . Enzymatic parameters, K<sub>m</sub> and k<sub>cat</sub> were determined for both substrate isomers.

#### 2.3.3. Neutrophil elastase activity in bronco alveolar lavage

Proteolysis was started by adding 1 mM substrate in 30 µL of bronco alveolar lavage (BAL) samples. Samples were then immediately loaded in capillaries. EPR acquisition parameters were set as follows: Bo = 3423 G, sweep width = 120 G; sweep time = 10 s, attenuation = 25 dB; delay between scan = 30 s; modulation amplitude = 1 G; gain = 40 dB. Kinetic reactions were followed for 8 h at 25 °C. All experiments were repeated on 4 or 5 different mice. The resulting slope of progress curves [Product] = f(time) were plotted against the various genotypes in a histogram representation. Results were normalized with the condition WT infected.

### 2.4. Mouse inflammation model

#### 2.4.1. Generation of mice deficient in CG, NE, and PR3

Simultaneous deficiency of the *Prtn3* and *Ela2* gene cluster (129S6/



SvEv), deficiency in CG(129S6/SvEv-C57BL/6J), and deficiency in NE (129S6/SvEv-C57BL/6J) were generated by targeted mutagenesis as described elsewhere [21–23]. NE-PR3-deficient mice and CG-deficient mice were crossbred to generate heterozygote-deficient progeny (F<sub>1</sub>). The F<sub>1</sub> progeny were intercrossbred to generate mice deficient in NE, PR3, and CG, referred to as NSP-KO [3]. Mouse strains were subsequently backcrossed (eight generations) on a pure C57BL6/J background. Mice were housed in a pathogen-free facility with food and water *ad libitum* and a 12-h light/dark cycle.

Animal handling and procedures were approved by the Animal Studies Committee at our institution (Health and Animal Protection Office, Châlons-en-Champagne, France, Authorisation number: 51–31) in accordance with the guidelines of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations and following the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used in scientific procedures.

#### 2.4.2. Bacteria and intranasal infection

*P. aeruginosa* H103 was kindly provided by Dr. Hancock (Vancouver, BC, Canada) [24]. An overnight bacterial culture (1 mL) was grown in Luria Bertani broth (10 mL) at 37 °C to late exponential phase (3 h). Bacteria were washed twice with PBS (pH 7.4) and the optical density (OD) of the cultures was determined at 600 nm ( $OD_{600\text{nm}} \approx 1 \times 10^9$  bacteria/mL).

Mice ( $n = 5$  mice/genotype) were challenged intranasally with bacteria and sacrificed at fixed time points. Briefly, mice were anesthetized by intraperitoneal (intraperitoneal) injection of ketamine hydrochloride (75 mg/kg) and medetomidine hydrochloride (1 mg/kg). Next, mice were challenged intranasally with 50  $\mu$ L of saline buffer (PBS) containing a predetermined sublethal dose of bacteria ( $10^6$  CFUs/per mouse) [25]. Control mice ( $n = 5$  mice/genotype) were challenged with 50  $\mu$ L of sterile PBS alone. WT mice, NE-KO deficient mice and NSP-KO mice were sacrificed at 24 h post-infection. At this time point, mouse lungs were analyzed for inflammatory cell recruitment and detection of free active NE. Of note, all types of mice displayed a morbid state that was more marked in KO mice after 24 h.

#### 2.4.3. BAL collection

Mice were sacrificed, and the lungs were gently perfused with saline via the right ventricle. The trachea was exposed through a midline incision and was cannulated using a sterile 22-gauge catheter (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Lungs were lavaged *in situ* (BAL), with 1 mL of PBS, pH 7.4, cycled in three times. Identical recoveries of BAL (700  $\mu$ L per mouse) were obtained for each mouse [26]. Total cell and differential counts were immediately performed on aliquots of BAL fluids. The remaining BALs were centrifuged, aliquoted, and stored in – 80 °C until use.

### 2.5. OMRI

#### 2.5.1. EPR cavity and MRI system

The OMRI system used in all experiments is an EPR cavity (Bruker, Wissemburg, France) inserted at the center of Cirrus Open 0.2 T MRI system (MRI Tech, Canada). This permanent magnet at 0.193 T is operated at a proton frequency of 8.24 MHz and maximal field gradient strength was 20 mT/m in the three directions of space.

Electron spin saturation was carried out in the EPR cavity, which has a cylindrical geometry (240 mm diameter and 28 mm width). An opening (28 mm diameter) in the middle of the cavity enabled sample positioning. Its design and mode of operation, Transverse-Electric TE011 mode, was the focus of the development in order to minimize the impact of electromagnetic HF field [27] and to limit Eddy currents [17].

The HF amplification channel, including a synthesizer and two specific amplifiers (RFPA, Artigues-pres-Bordeaux, France), generated the HF wave. The EPR resonance frequency was around 5.4 GHz, according to the central EPR frequency of the nitroxide of interest. The

resonant cavity was tuned and matched with the help of a network analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) at this resonance frequency.

#### 2.5.2. Pulse sequences

2D magnetic resonance images were generated with a Gradient Echo sequence. It was modified to include a continuous EPR saturation during all the acquisition which started 300 ms prior to the first NMR RF pulse. All MR adjustments were done manually, using the same fixed parameters: TE/TR = 20/200 ms, field of view 40 \* 40 mm<sup>2</sup>, Matrix size 64 \* 64, flip angle 30°, receiver bandwidth 20 kHz, with and without HF irradiation (S<sub>ON</sub> and S<sub>OFF</sub>).

#### 2.5.3. Overhauser enhancements and EPR frequency

The EPR irradiation frequency was adjusted on the 4th peak upfield of the EPR spectrum of the nitroxide to have a specific excitation of the nitroxide of interest. Frequency sweep experiments were carried out to characterize OMRI response of substrate and product at 1 mM each. The Overhauser enhancement was calculated as the ratio of the absolute value of the NMR signal-to-noise ratio (SNR) in the presence of electron saturation divided by the SNR measured without electron saturation (S<sub>OFF</sub>).

The DNP factor (DNPF) is defined as  $\langle Iz \rangle / I_0 - 1$  where  $\langle Iz \rangle$  stands for the expected value of proton magnetization in the presence of EPR saturation and  $I_0$  is the equilibrium proton magnetization. Assuming a steady-state electron saturation,

$$\text{DNPF} = (\rho fs/n) \gamma_s / \gamma_I, \quad (1)$$

where  $\gamma_s$  and  $\gamma_I$  are the electron and proton gyromagnetic ratio, respectively,  $\rho$  the electron-nucleus coupling factor,  $n$  the number of EPR lines,  $s$  the saturation factor and  $f$  the leakage factor. The leakage factor can be expressed as:

$$f = r_1 \cdot [c] / (R_{10} + r_1 \cdot [c]),$$

where  $[c]$  is the nitroxide concentration,  $r_1$  its longitudinal relaxivity and  $R_{10}$  is the proton longitudinal relaxation rate constant in the absence of nitroxide. Due to the negative sign of the electron gyromagnetic ratio and the positive sign of the coupling factor (mostly dipolar in liquids), the Overhauser effect induce an out-of-phase shift of the proton magnetization and thus a negatively signed DNPF. The relationship between the Overhauser enhancement and the DNPF is:

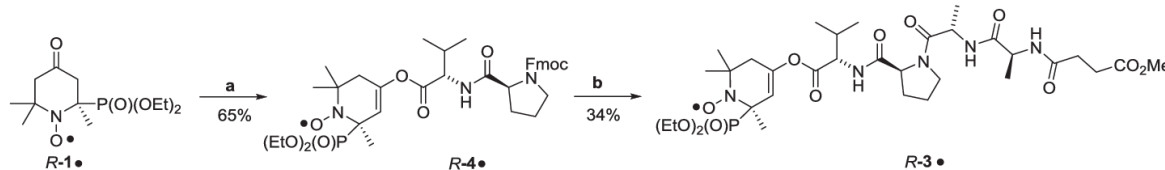
$$\text{Overhauser enhancement} = |\text{DNPF}| - 1$$

DNP factor vs nitroxide concentration were evaluated by curve fitting to Eq. (1) with  $R_{10} = 0.4 \text{ s}^{-1}$  and  $r_1$  (determined from inversion-recovery experiments) as fixed parameters, and the product  $s \cdot \rho$  as a floating parameter.

Details on the theoretical background can be found in Overhauser [28], Abragam et al. [29] and a summary is given in Mellet et al. [27]. Overhauser enhancements were finally plotted against EPR frequency and specific irradiation frequency was selected for each nitroxide form (Fig. 6). Lineshape were evaluated from curve fit to a lorentzian function. Nitroxide relaxivity was calculated from inversion-recovery experiments [30]. Inversion times ranged from 10 ms to 10 s. NMR signals vs inversion delay were fitted to a single exponential recovery curve and relaxation rate constants vs nitroxide concentration (0–2 mM range) were adjusted with a linear model.

#### 2.5.4. Kinetic measurements *in vitro*

OMRI of proteolysis kinetics was performed both by looking at the substrate consumption and by looking at the product formation in separate experiments. Experiments were done in the presence of 40 nM NE (product kinetic) and 20 nM NE (substrate kinetic). Kinetics of hydrolysis were started by adding 0.5 mM substrate (product formation) or 1 mM (substrate consumption). Control experiments were carried out without enzyme. For each nitroxide form, two sets of 2D images were



**Scheme 2. Preparation of R-3:** (a) Reagents and conditions: a) LiHMDS, **4**, THF,  $-78$  to  $-45$  °C, 65%; b) (1) DBU, DCM, 0 °C, 3 h; (2) **8**, DMF, rt, 18 h, 34% for both steps 1 and 2.

acquired at various time intervals with and without electron saturation with the imaging parameters described above.

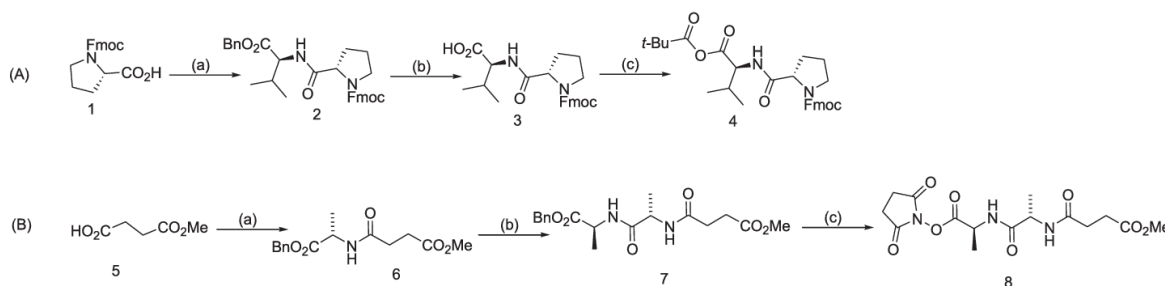
### 3. Results

#### 3.1. Synthesis of the methoxy-succinyl-alanine-alanine-proline-valine-nitroxide enol ester

As mentioned above, nitroxides **1**•/2• exhibit high potential to investigate proteolysis both by EPR and OMRI. Recently, enantiomers of **1**• were separated, identified and, then used for the preparation of the peptide-nitroxide substrate (reported elsewhere [31]).

After applying a similar approach, (details of the synthesis modifications are published elsewhere [31]) peptide-nitroxides **R-3**• and **S-3**• putatively specific of neutrophil elastase protease were prepared in two steps (Scheme 2 and Material and Methods section), in the first step, the condensation of the activated peptide **4** (Scheme 3A and see Material and Methods section) with the enolate of **R-1**• to yield nitroxide **R-4**•, and, in the second step, coupling of **R-4**• with the activated peptide **8** (Scheme 3B) to afford **R-3**•. The same procedure was applied to **S-1**• to yield **S-3**• (overall yield of 45%, see Material and Methods section).

Activated peptides **4** and **8** were prepared according to conventional procedures (Scheme 3A and B, respectively). That is, using the standard DCC procedure Fmoc-protected L-proline **1** is coupled to benzyl-protected L-valine to afford dipeptide **2** in 98% yields. The latter is quantitatively debenzylated into dipeptide **3** which was transformed into activated anhydride **4** using pivaloyl chloride (Scheme 2A) [32,33]. The second fragment **8** was synthesized in 3 steps from Succinic acid monomethyl ester **5** and used without further purification. Using DCC coupling procedure, peptide **6** was prepared in 88% yield by coupling **5** with L-Ala-OBn.HCl. Debzilylation of **6** followed by coupling with L-Ala-OBn.HCl provided the benzyl protected dipeptide **7** in 87% yields. Dipeptide **7** was then deprotected and converted into its NHS ester **8** using N-hydroxy succinimide and DCC (Scheme 3B). [34] Crude **8** was used in the preparation of **R-3**• and **S-3**• without further purification.



**Scheme 3. Preparation of activated peptide 4 (A) and 8 (B).** Reagents and conditions for (A): (a) L-Val-OBn, HOBT, DCC, DIPEA, DCM, 0 °C to rt, 18 h, 98%; (b) Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, 10 h, rt, quantitative; (c) *t*-BuCOCl, Et<sub>3</sub>N, 0 °C, 1 h; and for (B) (a) L-Ala-OBn.HCl, HOBT, DCC, DIPEA, DCM, 0 °C to rt, 18 h; (b) (1) Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, 10 h, rt, (2) (a), 87% yield for both steps 1 and 2; (c) (1) Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, 10 h, rt, (2) N-hydroxy succinimide, DCC, THF, rt, 18 h, quantitative yield for each step.

#### 3.2. Enzyme kinetics of substrate to product hydrolysis by NE

##### 3.2.1. Enzymatic hydrolysis of the substrate

Chemical structures of substrate and enzymatic reaction product are illustrated in Scheme 4.

As a preliminary experiment, the kinetics of hydrolysis of the substrate by neutrophil elastase was studied by EPR (Fig. 1).

The EPR parameters including nitrogen and phosphorus hyperfine coupling constants ( $a_N$  and  $a_P$  respectively) as they appear before and after hydrolysis of substrate in the presence of NE are reported in Table 1.

Owing to the difference of 4.9 G in their  $a_P$  values, substrate and product spectra are sufficiently resolved to avoid peaks overlapping, thus allowing individual quantification in a substrate/product mixture.

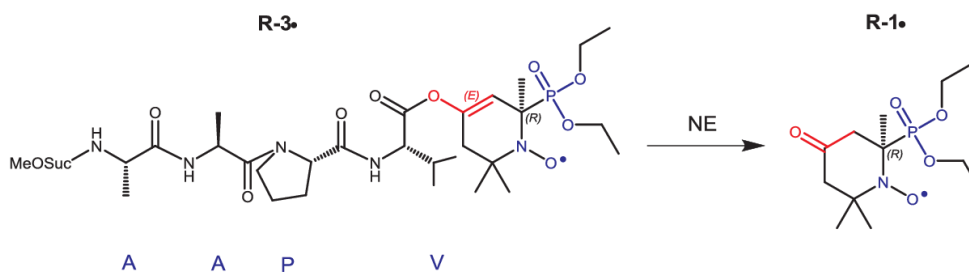
As described in Table 1, product's linewidth was 1.22 G while substrate's linewidth was 1.84 G. Thus, for EPR spectroscopy measurements the product will show a better sensitivity and for Overhauser-enhanced MRI specific excitation of the product will provide a greater signal enhancement compared to the substrate as outlined hereafter.

##### 3.2.2. Determination of the Michaelis constants

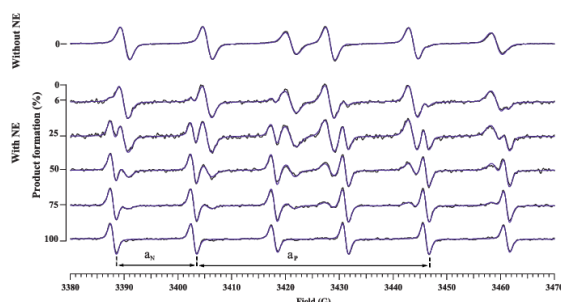
Kinetics of consumption of substrate and formation of product were monitored in the concentration range of 2.5–200  $\mu$ M (Fig. 2).

Initial velocities were deduced from the slope of the linear part of each progress curve displayed in Fig. 2. Finally, Michaelis-Menten plots (Fig. 3) allowed us to determine Michaelis constants (Table 2).

Kinetic constants for **R-3**• derived from these measurements are  $K_m = 15$   $\mu$ M and  $k_{cat} = 14$  s<sup>-1</sup>, indicating a catalytic efficiency,  $k_{cat}/K_m$ , of 940 000 s<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>. Constants for **S-3**• are  $K_m = 25$   $\mu$ M and  $k_{cat} = 16$  s<sup>-1</sup>, with  $k_{cat}/K_m$ , of 640 000 s<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>. Both isomers thus display similar kinetic constants, having a  $K_m$  4–7 fold lower than that of the reference chromogenic substrate MeO-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-pNA and a catalytic constant 6–9 fold higher [35]. These results suggest that better interactions occur with the P' part of the substrate, namely the nitroxide group, than with the widely used paranitroanilide leaving group, as the peptide that fills the P part was identical in the two substrates.



**Scheme 4.** Proteolytic reaction of MeO-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-(R)nitroxide enol ester into the ketone form of the nitroxide and a free peptide by neutrophil elastase (NE). The reaction is the same with the isomer S.



**Fig. 1.** EPR spectroscopy of the line-shifting nitroxide: hydrolysis of 40  $\mu\text{M}$  substrate **R-3•** by 0.8 nM protease NE yielding the product **R-1•**. Five EPR spectra are represented corresponding to five reaction steps: 6%, 25%, 50%, 75% and 100% of product formation. Only 6% of product was formed after the first EPR acquisition. Spectrum without NE corresponds to substrate **R-3•** (0% of product) whereas spectrum with NE at 100% illustrates the product **R-1•**. Spectra (dark lines) are fitted by a linear combination of substrate and product (blue lines). Hyperfine coupling of the unpaired electron with the phosphorus atom  $^{31}\text{P}$  (spin  $1/2$ ) and with the nitrogen atom  $^{14}\text{N}$  (spin 1) provide 6 EPR lines. Parameters  $a_{\text{P}}$  and  $a_{\text{N}}$  are phosphorus and nitrogen coupling constants deduced from EPR product or substrate spectra. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**Table 1**

**EPR parameters of substrate and product.** (a) Landé's factor (b) peak to peak linewidth of the fourth line. Enzymatic reaction induces a change in the phosphorus hyperfine coupling constant ( $a_{\text{P}}$ ) hence creating a shift of the EPR lines. This shift can be used to measure an enzyme activity by EPR *in vitro* or to create contrast *in vivo* by OMRI. The parameters were measured in HEPES buffer 50 mM at pH 7.4, 0.15 M NaCl and Igepal 0.05%.

Nitroxides	$a_{\text{N}}$ (G)	$a_{\text{P}}$ (G)	$g^{(a)}$	Linewidths (G) <sup>(b)</sup>
<b>Substrate</b>	15.5	38.4	2.0052	1.84
<b>Product</b>	14.9	43.3	2.0053	1.22

### 3.2.3. Specificity screening of the substrate

Enzyme specificity screening was carried out *in vitro*. Initial velocities of product formation for various enzymes are shown in Fig. 4.

Of the proteases of different classes tested, only Neutrophil Elastase, Proteinase 3 and Porcine pancreatic elastase were able to hydrolyze the substrate into product at a significant rate. This narrow specificity is similar to that observed for the paranitroanilide-based analogous substrate. As NE and Proteinase 3 are two inflammation markers released from neutrophils by various means including degranulation [36,37], this substrate is very promising for the study of pulmonary inflammatory diseases. As expected for an elastase with similar substrate preferences, Porcine Pancreatic Elastase (PPE) was also able to catalyze

substrate hydrolysis at a high rate of the same order of magnitude as NE. Again, the selectivity of the peptide-linked nitroxide is similar to the one of the paranitroanilide chromogenic substrate bearing the same peptide. It is however irrelevant in the context of most inflammation diseases since PPE is synthesized as an inactive pro-enzyme and activated only in the intestinal lumen. Thus, the simultaneous presence of both enzymes is impossible except in pancreatitis where premature activation of PPE coexists with a strong inflammation. These experiments yielded similar results for isomers S and R.

### 3.2.4. Relevance to inflamed lung situations

To determine the relevance of this substrate for *in vivo* imaging of inflammation, NE detection was carried out using bronchoalveolar lavages derived from a mouse model of *Pseudomonas* pneumonia characterized by an acute pulmonary inflammation. Mice were *intra nasally* challenged with sterile PBS or containing *Pseudomonas aeruginosa* [21]. To assess the accuracy and specificity of NE detection, mice deficient in NE (NE-KO) or the three serine proteases namely NE, Proteinase 3 and Cathepsin G (3KO) were employed along with their Wild Type littermates (WT) [3]. Initial velocities were recorded by EPR after adding 1 mM substrate directly in the BronchoAlveolar Lavages (BALs) (Fig. 5).

As expected, infected WT mice BALs contained the maximal enzymatic activity. Interestingly, the activity in infected NE-KO mice samples dropped by 50% compared to the infected WT samples. Furthermore, 3KO lost 70% of the reference activity. Since Cathepsin G is inactive and Proteinase 3 active on this substrate, this additional activity decrease in 3KO can be confidently attributed to the absence of Proteinase 3. All control mice displayed an activity in the range of that corresponding to the control spontaneous dissociation. To further support our findings, prior addition of Batimastat, a broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor to infected BALs had no effect on activity measurements (data not shown). Thus, the detected activity stems exclusively from the neutrophil proteases NE and to a lesser extent from Proteinase 3. The apparent difference between the infected and uninfected 3KO samples is not statistically significant in this set of experiments. The slightly higher values for the infected 3KO could nevertheless be easily explained by some minor enzyme activities brought by the bacteria *Pseudomonas*. *Pseudomonas* elastase, however, cannot contribute as seen in Fig. 4.

Clearly, enzymatic activities in the setting of tissue inflammation can be detected by EPR in infected mouse BALs with this substrate. Significantly, hydrolysis of this substrate is due to active neutrophil proteases and hence represents a selective marker of inflammation.

### 3.3. Images of elastase activity using Overhauser-enhanced MRI

Recently, the discovery of nitroxide-based substrates undergoing strong electronic resonance spectrum alteration upon enzyme action led to the concept of "Overhauser switch" [17,18]. Overhauser-enhanced imaging was proven possible *in vitro* and *in vivo*. Thus, the NE specific substrate was probed as a potential polarizing agent through *in vitro* and



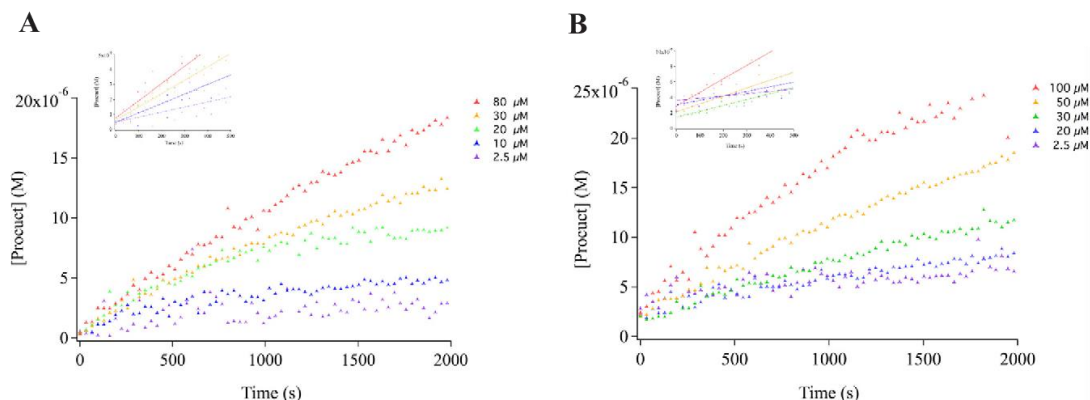


Fig. 2. Display of selected curves among those used for the calculation of the initial rate of product formation for a range of substrate concentration by 1 nM NE in HEPES buffer pH7.4 at 25 °C. A: isomer R; B: isomer S.

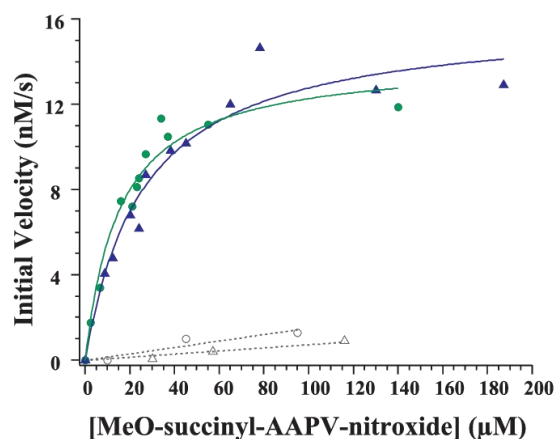


Fig. 3. Michaelis-Menten plot: initial velocities observed at different substrate concentrations (0–200 μM) in the presence of 1 nM NE. Both (R) and (S) substrate isomers are represented (blue triangles: isomer S and green circles: isomer R). Spontaneous dissociation for both isomers is also showed as dotted lines (open circles: Isomer R; open triangles: Isomer S). Both plots are fitted with the Michaelis-Menten equation (continuous lines). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 2

Enzymatic Michaelis constants for the (R) and (S) substrate isomers.

	R-3•	S-3•
$K_m$ (μM)	15 (± 2.9)	25 (± 5.4)
$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	14 (± 0.9)	16 (± 1.1)
$k_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	930,000	640,000

*ex vivo* OMRI experiments.

### 3.3.1. Properties of the substrate and the product as an OMRI contrast agent

The EPR irradiation frequency of the fourth line upfield was swept by tuning the cavity of the OMRI setup and the resulting MRI signal was plotted. The maximum signal enhancements were observed at distinct electronic EPR frequencies: 5425.6 MHz for the substrates R-3• or S-3• and 5414.4 MHz for the product 1• (Fig. 6) as predicted from the EPR spectra.

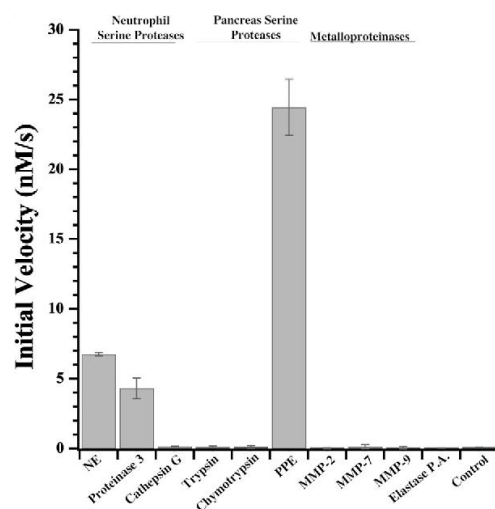


Fig. 4. EPR comparative kinetics of the nitroxide substrate isomer S hydrolysis by 9 different proteases. Kinetics of hydrolysis of 1 mM substrate was studied by EPR at 25 °C with 1 nM of each enzyme: NE, Proteinase 3, Cathepsin G, Trypsin, Chymotrypsin, PPE, MMP-2, MMP-7, MMP-9 and the metallo-elastase from *Pseudomonas Aeruginosa* (P.A). Substrate spontaneous dissociation in HEPES buffer is also represented as a control. Experiments were done in duplicate. Error bars represent the two limit values.

As for the EPR spectrometry study (*cf. Enzymatic hydrolysis of the substrate*), both lines are well separated and do not overlap. Linewidths are narrow enough to easily observe high signal enhancement in OMRI experiments. The full width at half maximum of the OMRI-derived EPR spectra in Fig. 6 was 7.4 MHz for the substrate R-3• and 4 MHz for the product R-1•. Thus, linewidths in OMRI data agree with the results obtained by EPR spectrometry. Difference in linewidth values could be explained by the difference in the molecular weight of each nitroxide form (cleaved or uncleaved) as it acts on the tumbling rate and a probable contribution of the conformational change that is expected to modify the hyperfine coupling with the cycle and methyl protons. Moreover, it can be noticed that the product EPR signal amplitude increased about 1.5 times upon hydrolysis thus facilitating proteolysis detection.

As the frequency domain of EPR irradiation in this OMRI experiment is narrow compared to the linewidths, each nitroxide can thus be

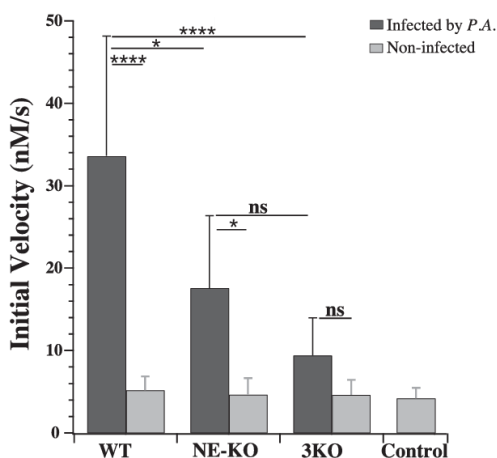


Fig. 5. Rate of product formation in bronchoalveolar lavages from unchallenged mice and mice infected by *Pseudomonas aeruginosa* (P.A.) for 24 h. 1 mM substrate was added extemporaneously. WT: wild type mice; NE-KO: mice Knocked-out for NE; 3KO: mice knocked-out for three neutrophil proteases. Control: spontaneous hydrolysis of the substrate. Significance bars are the result of an ordinary one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test.

observed selectively with specific irradiation. On one hand, irradiating a sample with the product EPR frequency will give access to the enzymatic activity. On the other hand, irradiating at the EPR frequency of the substrate will give access to its bio distribution.

The  $^1\text{H}$  longitudinal relaxivity  $r_1$  was measured through a classical MRI experiment for the substrate  $3\cdot$  and the product  $1\cdot$  and were equal to  $0.40\text{ s}^{-1}\text{ mM}^{-1}$  and  $0.42\text{ s}^{-1}\text{ mM}^{-1}$ , respectively. Those results are comparable to the relaxivity  $r_1$  of Oxo-TEMPO ( $0.5\text{ s}^{-1}\text{ mM}^{-1}$ ) (unpublished results) which is characteristic of a water accessible electron.

The OMRI sensitivity at 0.2 T was investigated (Fig. 7). Maximum DNP factors reached  $-26$  for the product at about 2 mM, and  $-6$  for the substrate at about 1.4 mM. It should be noted that enhancement is higher for the product. This discrepancy might be the consequence of a lower EPR saturation efficacy of the substrate EPR line, since the electronic saturation is correlated to the nitroxide linewidth.

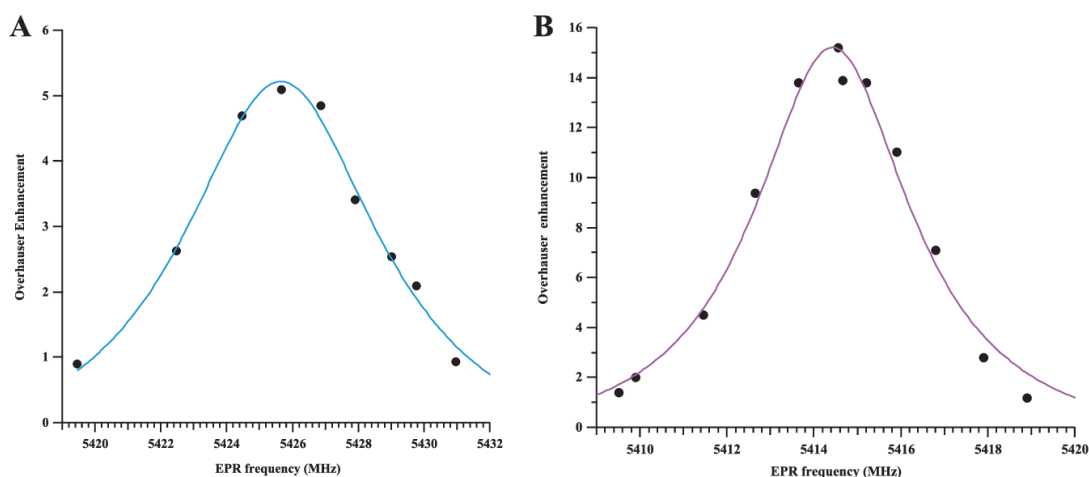


Fig. 6. Determination of the optimal excitation EPR frequencies for OMRI experiments: The EPR irradiation frequency of the fourth line upfield was swept and the resulting MRI signal was plotted. Overhauser signal enhancement of the substrate  $R-3\cdot$  (A) and product  $1\cdot$  (B) were fitted using a Lorentzian model. The MRI  $B_0$  field was 0.1936 T for the substrate and 0.1935 T for the product.

Interestingly, a DNP factor of  $-3$  corresponding to an Overhauser enhancement of 2 (or to 200% contrast) remains for 0.09 mM of product (as inferred from Eq. (1) in the Material and methods section), which is a concentration compatible with future *in vivo* experiments. This result showed a very good sensitivity of the method as low substrate and product concentrations can be detected with high contrast.

### 3.3.2. Enzyme kinetics by OMRI *in vitro*

Since the substrate and the product can be detected by OMRI enzyme activity imaging was probed. Hence, the substrate was reacted with neutrophil elastase and the hydrolysis was monitored by OMRI. Fig. 8 shows relevant images acquired with the EPR irradiation set at the product or the substrate frequency as a function of time.

A maximum Overhauser enhancement of 5 for the substrate was obtained at the beginning of the reaction whereas a maximum enhancement of 8 for the product was obtained at the end of the reaction. The estimated catalytic constant by OMRI using the initial slope of the time-resolved Michaelis kinetics ( $k_{\text{cat}} = 6\text{ s}^{-1}$ ) revealed a similar value than the one calculated by EPR (see Table 2). Thus this substrate is suitable for the detection neutrophil elastase activity by Overhauser-enhanced Magnetic Resonance Imaging. It is also an imaging method suitable to visualize the bio distribution of the substrate.

## 4. Discussion

Molecular imaging of enzyme activity by MRI is a long-sought-after tool. To achieve this, it was needed to produce a contrast and to trigger it specifically *via* enzyme activity. Since enzyme concentrations are mostly in the nanomolar range an amplification step was also necessary to overcome the gap of sensitivity with MRI which essentially produces images from the highly concentrated water protons. In this study high contrast was given by Overhauser-enhanced MRI in the presence of a nitroxide. The contrast was conditioned to enzyme catalysis by linking a specific peptide to a line-shifting nitroxide. Thus by choosing the EPR irradiating frequency of the "Overhauser switch" either the substrate or the product (hence the enzyme activity) would produce contrast. Furthermore, signal amplification naturally occurred from the enzyme turn-over as long as fresh substrate was present. The first approach was to target Neutrophil Elastase, a protease associated with numerous inflammatory diseases. After characterization, the substrate was successfully tested on samples from a *Pseudomonas aeruginosa* lungs infection.

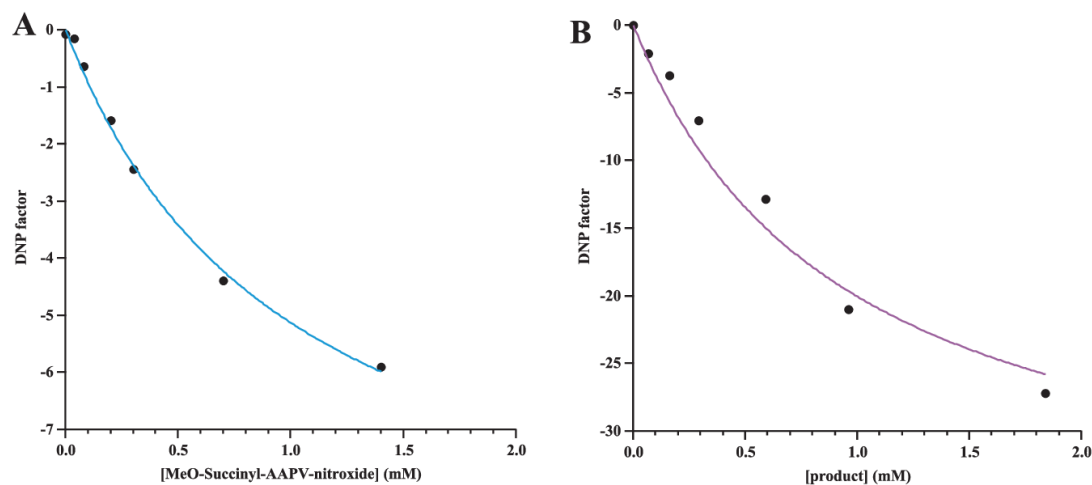


Fig. 7. DNP factor as a function of nitroxide concentration. A: Substrate  $3\bullet$  (Parameters: Saturation factor  $s = 0.25$ ; coupling factor  $\rho = 0.36$ ; relaxivity  $r_1 = 0.4 \text{ /s/mM}$ ); B: Product  $1\bullet$  (Parameters: Saturation factor  $s = 1$ , coupling factor  $\rho = 0.36$ ; relaxivity  $r_1 = 0.42 \text{ /s/mM}$ ).

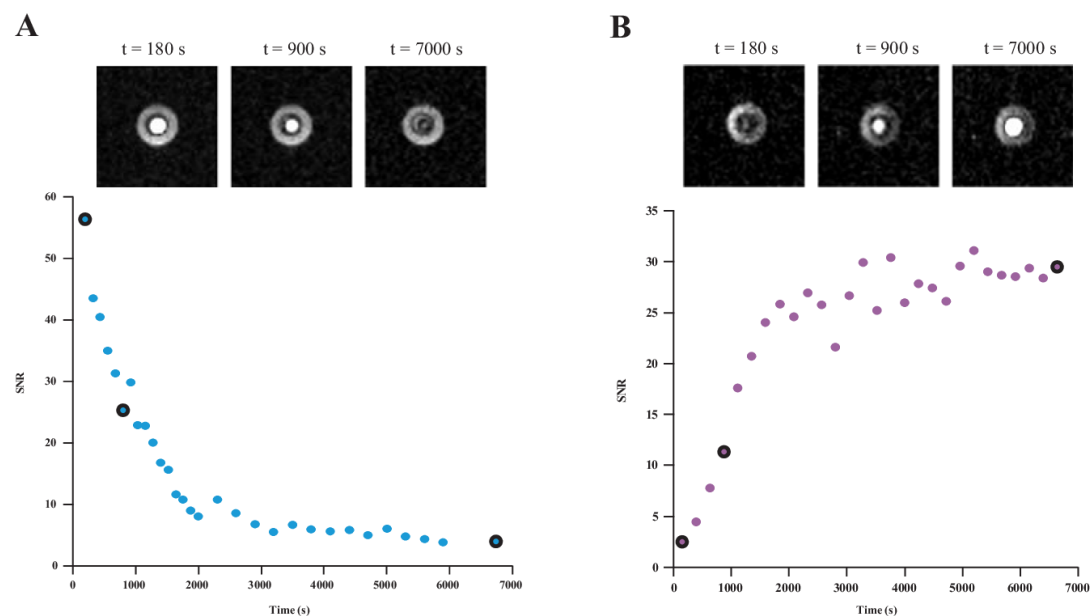


Fig. 8. OMRI monitoring of substrate consumption and product formation from elastase proteolysis. A: 2D images selected from the corresponding time course (highlighted points) of substrate consumption. The initial substrate concentration was 1 mM and the proteolytic reaction was accelerated by adding 20 nM enzyme. The EPR frequency was tuned at 5426 MHz. B: 2D images selected from the corresponding time course (highlighted points) of product formation. The initial substrate concentration was 0.5 mM and enzyme concentration was 40 nM. The EPR frequency was tuned at 5415 MHz.

The difficult but successful grafting of a chosen peptide on the shifting nitroxide core suggests that a new family of protease activity probe can be designed. Furthermore, the acetate enol ester [18] and the elastase-specific peptide enol ester have the same EPR spectrum and yield the same product after hydrolysis. Thus, the same instruments and the same settings will be valid regardless of the protease targeted. Expanding the targeted proteases by varying the peptide would allow exploring other pathologies like pancreatitis or tumors via their associated specific protease activity.

#### 4.1. The MeO-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-nitroxide is a specific and fast substrate for elastase.

The specificity tests show that MeO-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-nitroxide is a fast substrate for Neutrophil Elastase and in a lesser extent for Proteinase 3. All other tested proteinases including serine proteinases and metallo proteinases are ineffective. Particularly, the metallo elastase from *Pseudomonas aeruginosa* does not generate any product. Thus, with the irrelevant exception of pancreatic elastase, this substrate is a reliable marker of inflammation *via* neutrophil serine proteases. The

Michaelis constants for elastase reveal a better substrate than its optically active paranitroanilide analog. In mouse BALs from the present acute inflammation model an activity from 1 nM of NE is detected. In human, BALs are estimated to dilute the epithelial lining fluid of about one hundred fold [38]. Thus, the concentration of NE in lungs of wild type infected mice would be 100 nM *in vivo*. In this situation, using the Michaelis constants, a concentration as low as 75  $\mu\text{M}$  of substrate (5 times the  $K_m$ ) would generate 1.4  $\mu\text{M/s}$  of product which would thus reach 140  $\mu\text{M}$  in 100 s. Such a product concentration generates an OMRI contrast of 200% as deduced from the OMRI sensitivity plot. *In vivo* imaging of acute inflammation should then be possible within a short time provided that the substrate could be supplied quickly to the lungs prior to OMRI. In the case of cystic fibrosis concentrations of active elastase in the epithelial lining fluid are in the range of 2  $\mu\text{M}$  even for patients with mild lung disease [39]. This is 2000 fold the lower limit of our method thus ensuring a fast and strong signal in a few seconds.

#### 4.2. Towards a new tool first for research then for diagnosis

The first expected impact of this study is to provide a useful and very specific diagnostic tool for inflamed lungs. More specifically, the goal is to perform molecular MRI of any protease/inhibitor imbalance with a true 3D resolution firstly for Neutrophil Elastase but also Cathepsin G, Proteinase 3, MMP-12 and marginally for NSP4. It would then be possible to inventory the endangered areas in the lungs and later verify that a protective treatment with protease inhibitors has indeed inhibited the enzyme activity. This diagnosis at a molecular scale could be done prior to any anatomical alteration. Abnormal proteolysis would be visible thus at a much earlier stage of the disease when lung can still be preserved. For instance, in the *Pseudomonas aeruginosa* infection model it was possible to monitor the inflammation while the lungs were reversibly altered. Ultimately it could be used as a monitoring tool for a personalized treatment until protease activity is effectively inhibited. All images were performed using the same setup as for *in vivo* imaging of mice published earlier. Thus, at shorter term, the method could be used as a pre-clinical tool to develop protease inhibition strategies for emphysema or cystic fibrosis using animal experimental models with a real-time monitoring of protease activity inhibition *in vivo*. To this end, studies are ongoing.

New diagnosis on human could be done using the presented nitroxide substrate and EPR. For instance, since EPR is able to perform on samples that are opaque to the visible light it could be used to detect enzyme activity in tissue samples such as biopsies.

All OMRI experiments herein validated the use of the substrate MeO-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-nitroxide as a specific proteolysis probe for OMRI. Future *in vivo* experiments of proteolysis imaging will be done to visualize pulmonary inflammation *in situ*. Application to human diagnosis with OMRI will require further development. This stems from the EPR frequency that is about 650 times higher than NMR frequency. Consequently, at 0.2 T the electron resonance frequency is in the microwave range around 5.4 GHz. While it is possible to make mouse images this frequency is not suitable for larger animals because of low penetration depth. Interestingly, MRI at very low field is a currently active research area [40–44]. For instance at earth magnetic field the EPR frequency of nitroxides is in the range of several dozens of MHz, which allows convenient saturation of electron states and high penetration depths suitable for humans.

#### Acknowledgments

This study was achieved within the context of the ANR PULMOZYME (ANR-15-CE18-0012-01) and the Cluster of Excellence TRAIL ANR-10-LABX-57. The authors thank Aix-Marseille University for A\*MIDEX grant (ANR-11-IDEX-0001-02) funded by the Investissements d'Avenir French Government program, managed by

the French National Research Agency (ANR). ID is grateful for the funding from the People Program (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007–2013) under REA grant agreement no. PCOFUND-GA-2013-609102, through the PRESTIGE program coordinated by Campus France. We also thank "Fonds Agir pour les Maladies Chroniques", Rhône Alpes Auvergne.

#### Conflicts of interest

There are no conflicts of interest to declare.

#### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.006.

#### References

- J.B. Soriano, A.A. Abajobir, K.H. Abate, S.F. Abera, A. Agrawal, M.B. Ahmed, et al., Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015.GBD 2015 Chronic Respiratory Disease Collaborators, *Lancet Respir. Med.* 5 (9) (2017) 691–706, [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30293-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30293-X) Epub 2017 Aug 16. Erratum in: *Lancet Respir. Med.* 2017 Oct;5(10):e30.PMID:28822787.
- B. Korkmaz, M.S. Horwitz, D.E. Jenne, F. Gauthier, Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases, *Pharmacol. Rev.* 62 (4) (2010) 726–759, <https://doi.org/10.1124/pr.110.002733> (PubMed PMID: 21079042; PubMed Central PMCID: PMC2993259).
- N. Guyot, J. Wartelle, L. Malleret, A.A. Todorov, G. Devouassoux, Y. Pacheco, et al., Unopposed cathepsin G, neutrophil elastase, and proteinase 3 cause severe lung damage and emphysema, *Am. J. Pathol.* 184 (8) (2014) 2197–2210, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.04.015> (PubMed PMID: 24929239).
- C. Boudier, P. Laurent, J.G. Bieth, Leukoproteinas and pulmonary emphysema: cathepsin G and other chymotrypsin-like proteinases enhance the elastolytic activity of elastase on lung elastin, *Adv. Exp. Med. Biol.* 167 (1984) 313–317 (PubMed PMID: 6369910).
- K.A. Serban, D.N. Petrusca, A. Mikosz, C. Poirier, A.D. Lockett, L. Saint, et al., Alpha-1 antitrypsin supplementation improves alveolar macrophages efferocytosis and phagocytosis following cigarette smoke exposure, *PLoS One* 12 (4) (2017) e0176073, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176073> (PubMed PMID: 28448535; PubMed Central PMCID: PMC5407578).
- I. Schechter, A. Berger, On the size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 (2) (1967) 157–162 (PubMed PMID: 6035483).
- S. Matsumoto, H. Yasui, S. Batra, Y. Kinoshita, M. Bernardo, J.P. Munasinghe, et al., Simultaneous imaging of tumor oxygenation and microvascular permeability using Overhauser enhanced MRI, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (4) (2009) 17898–17903, <https://doi.org/10.1073/pnas.0908447106> (PubMed PMID: 19815528; PubMed Central PMCID: PMC2761243).
- J. Weaver, S.R. Burks, K.J. Liu, J.P. Kao, G.M. Rosen, In vivo EPR oximetry using an isotopically-substituted nitroxide: potential for quantitative measurement of tissue oxygen, *J. Magn. Reson.* 271 (2016) 68–74, <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2016.08.006> (PubMed PMID: 27567323; PubMed Central PMCID: PMC5266518).
- B. Epel, S.V. Sundramoorthy, M. Krzykawska-Serda, M.C. Maggio, M. Tseytlin, G.R. Eaton, et al., Imaging thiol redox status in murine tumors in vivo with rapid-scan electron paramagnetic resonance, *J. Magn. Reson.* 276 (2017) 31–36, <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2016.12.015> (PubMed PMID: 28092786; PubMed Central PMCID: PMC5336491).
- T. Kawano, M. Murata, F. Hyodo, H. Eto, N. Kosem, R. Nakata, et al., Noninvasive mapping of the redox status of dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis using in vivo dynamic nuclear polarization-magnetic resonance imaging, *Sci. Rep.* 6 (2016) 32604, <https://doi.org/10.1038/srep32604> (PubMed PMID: 27587186; PubMed Central PMCID: PMC5009327).
- I. Dhimitruka, A.A. Bobko, T.D. Eubank, D.A. Komarov, V.V. Khrantsov, Phosphonated trityl probes for concurrent in vivo tissue oxygen and pH monitoring using electron paramagnetic resonance-based techniques, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (15) (2013) 5904–5910, <https://doi.org/10.1021/ja401572r> (PubMed PMID: 23517077; PubMed Central PMCID: PMC3982387).
- J.-L. Clement, S. Barbati, C. Frejaville, A. Rockenbauer, P. Tordo, Synthesis and use as spin-trap of 5-methyl-5-phosphono-1-pyrroline N-oxide (DHPMPO), pH Dependence of the EPR parameters of the spin adducts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (9) (2001) 1471–1475, <https://doi.org/10.1039/B103830N>.
- S. Thetiot-Laurent, G. Gosset, J.L. Clement, M. Cassien, A. Mercier, D. Siri, et al., New amino-acid-based beta-phosphorylated nitroxides for probing acidic pH in biological systems by EPR spectroscopy, *ChemBiochem. Eur. J. Chem. Biol.* 18 (3) (2017) 300–315, <https://doi.org/10.1002/cbic.201600550> (PubMed PMID: 27885767).
- W. Takahashi, A.A. Bobko, I. Dhimitruka, H. Hirata, J.L. Zweier, A. Samouilov, et al., Proton-electron double-resonance imaging of pH using phosphonated trityl



- probe, *Appl. Magn. Reson.* 45 (9) (2014) 817–826, <https://doi.org/10.1007/s00723-014-0570-2> (PubMed PMID: 25530673; PubMed Central PMCID: PMC4268155).
- [15] G. Audran, L. Bosco, P. Bremond, T. Butscher, S.R. Marque, Solvent effect in beta-phosphorylated nitroxides. Part 4: detection of traces of water by electron paramagnetic resonance, *Org. Biomol. Chem.* 14 (4) (2016) 1288–1292, <https://doi.org/10.1039/c5ob02316e> (PubMed PMID: 26647997).
- [16] E. Parzy, V. Bouchaud, P. Massot, P. Voisin, N. Koonjoo, D. Moncelet, et al., Overhauser-enhanced MRI of elastase activity from *in vitro* human neutrophil degranulation, *PLoS One* 8 (2) (2013) e57946, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057946> (PubMed PMID: 23469112; PubMed Central PMCID: PMC3585236).
- [17] N. Koonjoo, E. Parzy, P. Massot, M. Lepetit-Coiffe, S.R. Marque, J.M. Franconi, et al., *In vivo* overhauser-enhanced MRI of proteolytic activity, *Contrast Media Mol. Imaging* 9 (5) (2014) 363–371, <https://doi.org/10.1002/cmml.1586> (PubMed PMID: 24729587).
- [18] G. Audran, L. Bosco, P. Bremond, J.M. Franconi, N. Koonjoo, S.R. Marque, et al., Enzymatically shifting nitroxides for EPR spectroscopy and overhauser-enhanced magnetic resonance imaging, *Angew. Chem.* 54 (45) (2015) 13379–13384, <https://doi.org/10.1002/anie.201506267> (PubMed PMID: 26376730).
- [19] D.J. Lurie, I. Nicholson, J.R. Mallard, Low-field EPR measurements by field-cycled dynamic nuclear polarization, *J. Magn. Reson.* (1969) 95 (2) (1991) 405–409, [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(91\)90230-Q](https://doi.org/10.1016/0022-2364(91)90230-Q).
- [20] P. Massot, E. Parzy, L. Pourtau, P. Mellet, G. Madelin, S. Marque, et al., *In vivo* high-resolution 3D overhauser-enhanced MRI in mice at 0.2 T, *Contrast Media Mol. Imaging* 7 (1) (2012) 45–50, <https://doi.org/10.1002/cmml.464> (PubMed PMID: 22344879).
- [21] A. Belaouaj, R. McCarthy, M. Baumann, Z. Gao, T.J. Ley, S.N. Abraham, et al., Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis, *Nat. Med.* 4 (5) (1998) 615–618 (PubMed PMID: 9585238).
- [22] D.M. MacIvor, S.D. Shapiro, C.T. Pham, A. Belaouaj, S.N. Abraham, T.J. Ley, Normal neutrophil function in cathepsin G-deficient mice, *Blood* 94 (12) (1999) 4282–4293 (PubMed PMID: 10590073).
- [23] K. Kessenbrock, L. Frohlich, M. Sixt, T. Lammemann, H. Pfister, A. Bateman, et al., Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating anti-inflammatory progranulin, *J. Clin. Invest.* 118 (7) (2008) 2438–2447, <https://doi.org/10.1172/JCI34694> (PubMed PMID: 18568075; PubMed Central PMCID: PMC2430496).
- [24] Y. Tamura, S. Suzuki, T. Sawada, Role of elastase as a virulence factor in experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice, *Microb. Pathog.* 12 (3) (1992) 237–244 (PubMed PMID: 1614334).
- [25] R. Boxio, J. Wartelle, B. Nawrocki-Raby, B. Lagrange, L. Malleret, T. Hirche, et al., Neutrophil elastase cleaves epithelial cadherin in acutely injured lung epithelium, *Respir. Res.* 17 (1) (2016) 129, <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0449-x> (PubMed PMID: 27751187; PubMed Central PMCID: PMC5067913).
- [26] S.D. Shapiro, N.M. Goldstein, A.M. Houghton, D.K. Kobayashi, D. Kelley, A. Belaouaj, Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice, *Am. J. Pathol.* 163 (6) (2003) 2329–2335, [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63589-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63589-4) (PubMed PMID: 14633606; PubMed Central PMCID: PMC1892384).
- [27] P. Mellet, P. Massot, G. Madelin, S.R. Marque, E. Harte, J.M. Franconi, et al., New concepts in molecular imaging: non-invasive MRI spotting of proteolysis using an Overhauser effect switch, *PLoS One* 4 (4) (2009) e5244, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005244> (PubMed PMID: 19396361; PubMed Central PMCID: PMC2671144).
- [28] A.W. Overhauser, Polarization of nuclei in metals, *Phys. Rev.* 92 (2) (1953) 411–415.
- [29] A. Abragam, J. Combrisson, I. Solomon, *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 245 (1957) 157.
- [30] R.L. Vold, J.S. Waugh, M.P. Klein, D.E. Phelps, Measurement of spin relaxation in complex systems, *J. Chem. Phys.* 48 (8) (1968) 3831–3832, <https://doi.org/10.1063/1.1669699>.
- [31] N.J. Indranil Duttgupta, G.érard Audran, Jean-Michel Franconi, Sylvain R.A. Marque, Philippe Massot, Philippe Mellet, Elodie Parzy, Eric Thiaudière, Nicolas Vanthuyne, Selective on/off-nitroxides as radical probes to investigate nonradical enzymatic activity by electron paramagnetic resonance, *Chem. Eur. J.* (2018), <https://doi.org/10.1002/chem.201800866> (In press).
- [32] B. McKeever, G. Pattenden, Total synthesis of trunkamide A, a novel thiazoline-based prenylated cyclopeptide metabolite from *Lissoclinium* sp, *Tetrahedron* 59 (15) (2003) 2713–2727, [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00294-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00294-1).
- [33] I. Duttgupta, D. Misra, S. Bhunya, A. Paul, S. Sinha, Cis–trans conformational analysis of  $\delta$ -azaproline in peptides, *J. Org. Chem.* 80 (21) (2015) 10585–10604, <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b01668>.
- [34] R. Rajagopalan, R.R. Kuntz, U. Sharma, W.A. Volkert, R.S. Pandurangi, Chemistry of bifunctional photoprobes. 6. Synthesis and characterization of high specific activity metalated photochemical probes: development of novel rhenium photoconjugates of human serum albumin and fab fragments, *J. Org. Chem.* 67 (19) (2002) 6748–6757 (PubMed PMID: 12227807).
- [35] C. Koehl, C.G. Knight, J.G. Bieth, Compared action of neutrophil proteinase 3 and elastase on model substrates. Favorable effect of S'-P' interactions on proteinase 3 catalysts, *J. Biol. Chem.* 278 (15) (2003) 12609–12612, <https://doi.org/10.1074/jbc.M210074200> (PubMed PMID: 12538645).
- [36] K. Ohlsson, I. Olsson, The extracellular release of granulocyte collagenase and elastase during phagocytosis and inflammatory processes, *Scand. J. Haematol.* 19 (2) (1977) 145–152 (PubMed PMID: 197589).
- [37] C.T. Pham, Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (7) (2006) 541–550, <https://doi.org/10.1038/nri1841> (PubMed PMID: 16799473).
- [38] S.I. Rennard, G. Basset, D. Lecossier, K.M. O'Donnell, P. Pinkston, P.G. Martin, et al., Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution, *J. Appl. Physiol.* 60 (2) (1986) 532–538 (PubMed PMID: 3512509).
- [39] M.W. Konstan, K.A. Hilliard, T.M. Norvell, M. Berger, Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150 (2) (1994) 448–454, <https://doi.org/10.1164/ajrccm.150.2.8049828> (PubMed PMID: 8049828).
- [40] M. Sarraçanie, C.D. LaPierre, N. Salameh, D.E. Waddington, T. Witzel, M.S. Rosen, Low-cost high-performance MRI, *Sci. Rep.* 5 (2015) 15177, <https://doi.org/10.1038/srep15177> (PubMed PMID: 26469756; PubMed Central PMCID: PMC4606787).
- [41] V.S. Zotev, T. Owens, A.N. Matlashov, I.M. Savukov, J.J. Gomez, M.A. Espy, Microtesla MRI with dynamic nuclear polarization, *J. Magn. Reson.* 207 (1) (2010) 78–88, <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2010.08.015> (PubMed PMID: 20843715; PubMed Central PMCID: PMC2956831).
- [42] D. Grucker, *In vivo* detection of injected free radicals by overhauser effect imaging, *Magn. Reson. Med.* 14 (1) (1990) 140–147 (PubMed PMID: 2161981).
- [43] P.J. Ross, L.M. Broche, D.J. Lurie, Rapid field-cycling MRI using fast spin-echo, *Magn. Reson. Med.* 73 (3) (2015) 1120–1124, <https://doi.org/10.1002/mrm.25233> (PubMed PMID: 24753306).
- [44] D.E.J. Waddington, M. Sarraçanie, H. Zhang, N. Salameh, D.R. Glenn, E. Rej, et al., Nanodiamond-enhanced MRI via *in situ* hyperpolarization, *Nat. Commun.* 8 (2017) 15118, <https://doi.org/10.1038/ncomms15118> (PubMed PMID: 28443626; PubMed Central PMCID: PMC5414045).



#### 4.4. Détection par OMRI de l'activité protéolytique in vivo

Le modèle pathologique utilisé ici est l'inflammation pulmonaire induite par du lipopolysaccharide (LPS) extrait de bactéries Gram-négatives, connu pour induire une forte réponse immunitaire avec la production de molécules variées pro-inflammatoires.

Du nitroxyde-substrat ou du nitroxyde-produit ont ensuite été instillés par voie intratrachéale des souris LPS (N=8). Elles ont été suivies par OMRI durant 30 minutes et les images furent acquises à 3, 15 et 30 minutes après instillation.

##### 4.4.1. Activité enzymatique : Dégradation du nitroxyde-substrat par OMRI

Des souris ayant été en contact avec le LPS ont été instillées avec 70 $\mu$ L de substrat SuccAAPV-Nitroxide à 25 mM. La cavité micro-onde a été réglée à une fréquence de 5431,1 MHz (fréquence RMN de 8,251MHz) pour visualiser le substrat dans les poumons.

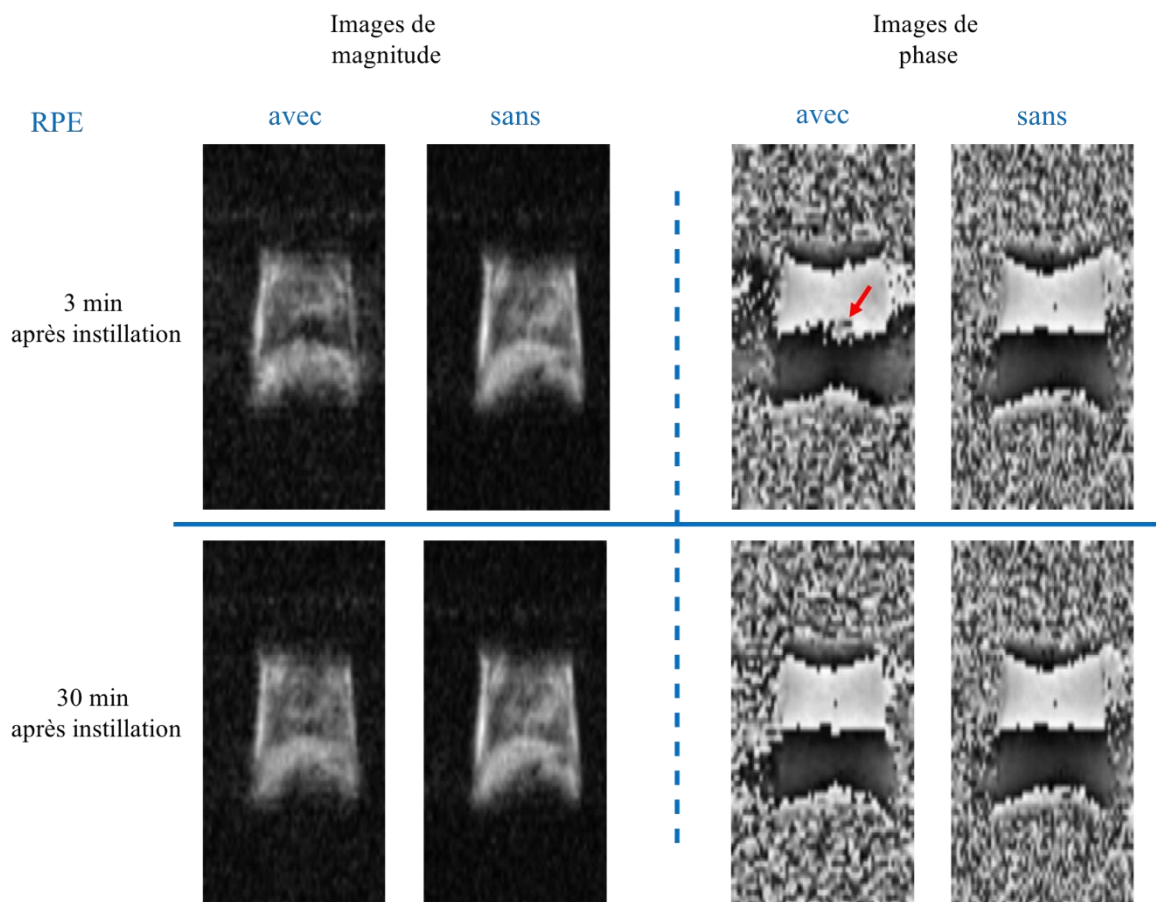


Figure 39 : Coupes coronales de poumons de souris LPS à 3 et 30 minutes après instillation

intratrachéale de nitroxyde- substrat à 25mM. Les images de magnitude et de phase sont présentées pour révéler l'effet Overhauser. La flèche rouge sur l'image de phase avec RPE à 3 min après instillation indique l'inversion de phase.

Sur la figure 39, 3 min après instillation intratrachéale, un gain s'élevant à 0,5 avec une inversion de phase a été mesuré chez des souris en situation inflammatoire induite par le LPS. L'effet Overhauser disparaît au bout de 30 minutes du champ de vue, même en imagerie de phase, et ce dans l'entièreté des poumons.

La figure 40 résume l'évolution de l'effet Overhauser sur une cohorte de souris saines (section 4.2.2) et LPS. L'effet est stable tout au long du suivi OMRI chez la souris saine, tandis que chez la souris en condition inflammatoire, le rehaussement est plus faible et l'effet Overhauser tend à disparaître. Un test de Wilcoxon a permis de montrer des différences significatives entre les deux états physiologiques des souris (saines et LPS) à 3, 15 et 30 min après instillation intratrachéale. En effet, les valeurs p sont inférieures à 5% à 15 min et à 1% à 3 et 30 min.

La cinétique de dégradation du substrat est un indicateur de la présence d'élastase du neutrophile chez la souris en situation inflammatoire induite par du LPS.

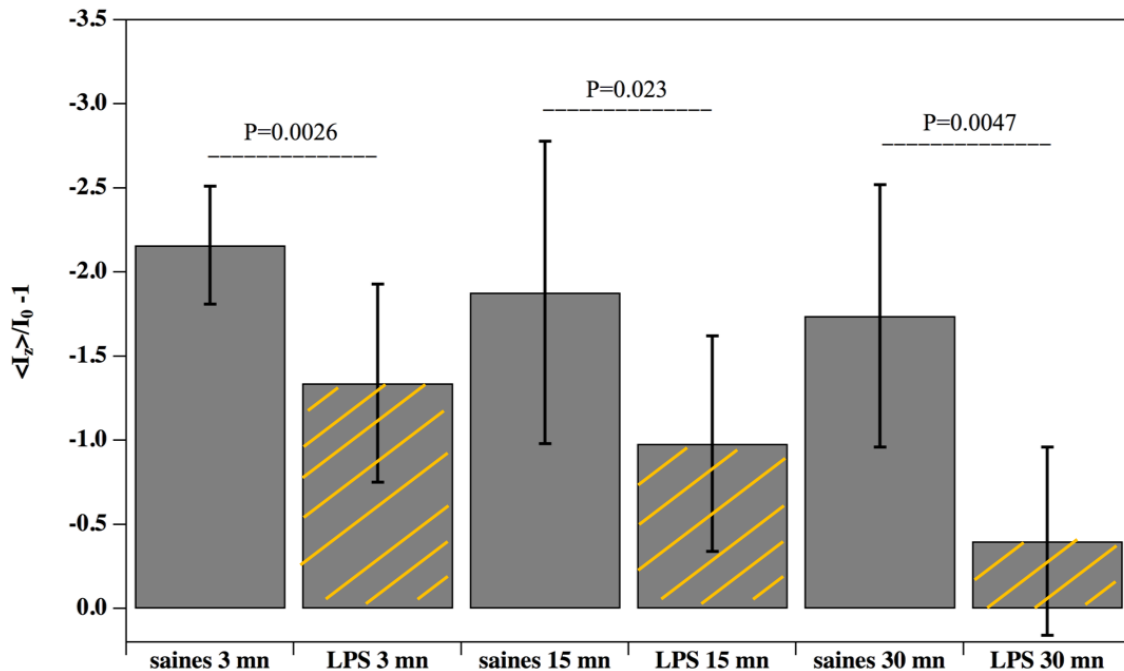


Figure 40 : Comparaison de l'effet Overhauser entre les souris saines et LPS à 3, 15 et 30 min après instillation intratrachéale. Le test de Wilcoxon a permis d'obtenir des valeurs p inférieures à 5%.

## 4.4.2. Activité enzymatique : Formation du nitroxyde-produit par OMRI

Afin de détecter l'activité enzymatique de l'élastase qui est attendue pour les souris LPS, la cavité été accordée à la fréquence du nitroxyde-produit, soit 5458.1MHz pour une fréquence IRM de 8,247MHZ. Différentes conditions expérimentales ont été explorées pour visualiser l'activité protéolytique dans les poumons.

Tout d'abord, une série d'instillations, sur des souris saines, combinant l'élastase du neutrophile à des concentrations variant de 0,05 à 2  $\mu\text{M}$  immédiatement suivies d'instillations de substrat de 5 à 25 mM, n'ont pas permis de visualiser la formation de produit par OMRI, pour des durées d'observation de 3 à 30 minutes.

Ensuite, des souris LPS instillées avec du substrat SuccAAPV-Nitroside à 25 mM, ont été suivies durant 30 minutes sans constater aucun effet Overhauser.

En parallèle de ces expérimentations, des poumons de souris saines, ayant reçu par instillation intranasale 50 $\mu\text{L}$  de nitroxyde-cétone à 100 mM, ont été isolés et broyés, le processus durant environ 1/2 heure. Le spectre RPE du broyat montre des traces de produit à 4  $\mu\text{M}$ , ce qui, compte tenu de la dilution du volume de cétone instillé, représente environ un facteur 200 de disparition. Les lavages broncho-alvéolaires réalisés chez les souris LPS et saines n'ont montré aucune trace de produit par spectrométrie RPE (figure 41).

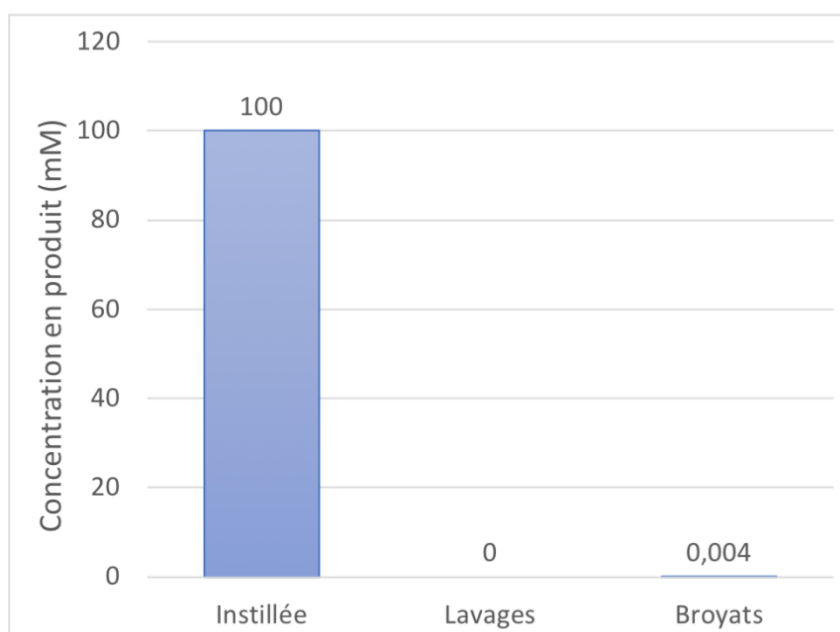


Figure 41: Concentrations du produit mesurées par spectroscopie RPE provenant d'échantillons de lavages broncho-alvéolaires et des broyats de poumons, de souris saines instillées avec 100mM de nitroxyde.

En conclusion, un problème apparemment insurmontable subsiste quant à la détection par OMRI du nitroxyde-produit par la catalyse. Les hypothèses émises (internalisation cellulaire ou métabolisation, *vide supra*) ne sont pas invalidées par ces mesures *ex vivo* et *in vivo*.

Dans la mesure où l'apparition du nitroxyde-produit (plutôt que la disparition du substrat) semble le meilleur moyen de détection de l'activité de l'élastase, il semble approprié d'apporter des modifications chimiques dans la structure moléculaire de la cétone afin de préserver sa rémanence in vivo dans les poumons

## 5. Discussion et Perspectives

L'objectif initial de ce travail était de proposer des séquences d'IRM rehaussée par effet Overhauser afin de détecter l'activité de l'élastase du neutrophile dans le poumon de souris en situation inflammatoire. Ce type d'approche combine à la fois l'utilisation d'une méthode physique qui repose sur le phénomène de polarisation dynamique nucléaire, une synthèse chimique originale qui a produit des nitroxydes à réponse spectroscopique univoque quand la molécule change de structure, une spécificité biochimique permettant d'utiliser ces nitroxydes comme rapporteurs d'un bio-marqueur qu'est l'élastase, et enfin un contexte pré-clinique qui met en place ces trois précédents éléments *in vivo* chez le rongeur. Cette synergie de quatre domaines scientifiques plus ou moins proches n'a pu être possible que par la collaboration étroite et au long cours de 3 unités de recherches, UMR 7273 à Marseille, le Centre International de Recherche en Infectiologie à Lyon, et enfin le laboratoire d'accueil.

Les retombées possibles de l'imagerie moléculaire de la protéolyse en situation inflammatoire sont importantes, en ce qu'elle autoriserait un diagnostic plus précoce, l'évaluation et la validation *in situ* de médicaments anti-protéase qui ont un intérêt indubitable en thérapie.

Dans ce contexte général, le travail s'est principalement concentré sur les aspects méthodologiques de l'OMRI *in vivo*, avec cette nouveauté qu'est l'IRM du poumon à champ faible. Un effort particulier a également été consenti pour contrôler le modèle animal dans ces conditions d'imagerie *in vivo*, notamment en ce qui concerne les protocoles d'instillation.

Cette activité de recherche a produit un certain nombre de résultats, encourageants certes, mais incomplets, qu'il convient maintenant de questionner.

## 5.1. OMRI de la souris à 0.2T : originalité et limitations

L'OMRI à 0.2T a été développée dans le laboratoire d'accueil depuis 2003. Cette approche diffère sensiblement de celle utilisée dans d'autres laboratoires qui utilisent des champs plus faibles, par ex. 6,5mT dans le laboratoire de M.S. Rosen (Sarracanie et al., 2014; Waddington et al., 2018). Dans ces derniers cas, l'avantage est indubitablement une fréquence de RPE plus faible, ce qui limite les échauffements par perte diélectrique et améliore la pénétration des ondes HF. Cependant, les systèmes utilisés à champ très faibles, souvent très expérimentaux, n'offrent pas des systèmes de gradients d'induction suffisamment effectifs pour permettre une localisation 3D millimétrique de l'effet Overhauser, d'autant plus qu'à champ faible, le signal disponible peut venir à manquer, même en le rehaussant. C'est pourquoi le système opérant à 0.194T (soit 5,4 GHz pour l'électron), avec des gradients pouvant atteindre 20 mT/m en 1ms, a été choisi, ce qui a occasionné un certain nombre de difficultés qui ont été résolues en amont de ce travail de thèse.

Ainsi, il a pu être démontré que la puissance HF effective dans la cavité est de 4 W environ au maximum, ce qui permet l'irradiation de la souris avec un cycle utile de 3% (20 secondes toutes les 10 minutes) avec une puissance spécifique de 10 W/kg environ. L'élévation de température atteint environ 2°C en fin d'irradiation et diminue sous l'effet de la perfusion entre deux expériences. D'autre part, compte tenu des conductivités électriques des tissus examinés, on peut démontrer que la profondeur de pénétration est de l'ordre du centimètre, ce qui est suffisant pour une souris confinée dans 25 mm. Le système est ainsi compatible avec l'expérimentation sur les souris, et certaines d'entre elles ont même fait l'objet d'expérimentations répétées en OMRI sans induire de mortalité

L'OMRI à 0.2T revient donc à réaliser la RMN à champ faible (au regard des standards en IRM) et la RPE à champ élevé. La réalisation d'images en 3D en résolution millimétrique est naturellement difficile dans ces conditions et l'imagerie moléculaire d'espèces diluées nécessite un rehaussement, ici par effet Overhauser, qui a l'avantage d'être obtenu à la demande et *in situ*, ce qui n'est pas le cas des méthodes d'hyperpolarisation concurrentes (Nikolaou et al., 2015; Cavallari et al., 2018). Celle-ci sont néanmoins polyvalentes, car réalisables à n'importe quel champ, alors que notre système est figé par la valeur de l'induction.

## 5.2. IRM 3D du poumon : le choix de la séquence FSE3D *in vivo*

Il est à présent bien admis que les séquences radiales à temps d'écho ultra-courts sont une alternative crédible pour acquérir les données brutes sur des organes présentant des T2 et T2\* faibles, comme dans le poumon ou les os. Ceci est d'autant plus vrai à champ usuel (3T) (Togao et al., 2010) ou élevé (4,7T ou 7T) (Guo et al., 2018; Olsson et al., 2007), lorsque ces constantes de temps raccourcissent à mesure que l'induction augmente. Les séquences radiales sont intrinsèquement moins résolutive que les séquences cartésiennes, car l'échantillonnage des données périphériques de l'espace réciproque est plus lâche qu'en son centre. De grand nombre de projections sont nécessaires pour obtenir une bonne résolution spatiale, au détriment de la durée d'acquisition, ce qui a encouragé l'émergence de méthodes d'acquisitions sous-échantillonnée, plus rapide, avec une perte limitée de la qualité d'image. C'est ce principe qui a été repris ici, l'acquisition radiale UTE3D a été expérimentée. Pour des raisons intrinsèques à l'appareillage, un nombre de projection de 845 a dû être choisi pour un TR minimum de 20 ms, soit 17 secondes d'acquisition (durée d'irradiation RPE). Des matrices plus grandes avec 11830 projections ont servi de matrice de référence pour effectuer un remplissage des données et ainsi obtenir une meilleure résolution. Ce paradigme fonctionne correctement dans le poumon de souris et les images UTE3D donne un signal bien détectable dans les poumons pour les matrices natives résolues acquises en 4 minutes. Ceci est moins vrai pour les matrices sous-échantillonnées et ensuite reconstruite après remplissage. Ceci est dû à un trop fort sous-échantillonnage, ce qui conduit à une résolution trop faible. C'est très probablement pourquoi l'effet Overhauser n'a pas pu être détecté dans les poumons de souris *in vivo* après instillation de nitroxydes, et ce malgré un grand nombre d'animaux testés. À ce propos, il convient de s'interroger sur les résolutions apparentes des matrices cartésiennes reconstruites : les valeurs de 310  $\mu\text{m}$  et 620  $\mu\text{m}$  pour les matrices complètes et sous-échantillonnées, données dans le paragraphe 3.4.1, résultent du simple calcul du rapport du champ de vue rapporté à la taille de la matrice. Ces valeurs ne correspondent vraisemblablement à aucune réalité. En effet, le critère de Nyquist indique qu'une résolution de 0.31 mm sur les trois axes pour un champ de vue de 40 mm requiert 51000 projections, un nombre de loin supérieur au 11830 utilisées. Dans le cas de la matrice sous-échantillonnée, la valeur de 845 projections conduirait à une résolution effective de l'ordre de 2 mm sur les trois axes. Celle-ci semble insuffisante pour révéler le rehaussement par effet Overhauser dans les poumons, ou même l'inversion de phase. Une telle situation avait été anticipée, mais un plus grand nombre de projections aurait conduit à des acquisitions plus longues, incompatibles avec un échauffement possible de l'animal. De guerre lasse, ceci nous a conduits à utiliser la séquence d'écho de spin accélérée.

La séquence FSE3D avait été utilisée dans des expériences préliminaires sur le poumon de souris. Ici, l'évaluation de cette séquence a été effectuée lors d'une batterie de mesures-tests sur le poumon de souris, en faisant varier le TR, la taille des matrices d'acquisition et le TE effectif. Les paramètres finaux sont ceux qui sont rappelés dans la section "Matériel et Méthodes". L'approche classique "keyhole" a été utilisée pour l'effet Overhauser, avec de plus une durée d'irradiation RPE raccourcie à 19s pour une acquisition de 38s. Les images obtenues peuvent être qualifiées de correctes, avec un signal détectable dans le parenchyme pulmonaire. Ceci a été possible grâce à une valeur de T2 dans les poumons de l'ordre de 25 ms, une valeur très favorable pour préserver le signal en écho de spin accéléré. A 4,7 T, le T2 dans les poumons s'élève à 9,7 ms (Olsson and Hockings, 2016). On notera donc l'avantage indéniable d'un faible champ de polarisation en cette occurrence.

L'IRM et l'OMRI du poumon de souris a ainsi été réalisée par la suite en utilisant cette séquence FSE3D



### 5.3. OMRI de la protéolyse dans les poumons de souris

L'imagerie moléculaire de l'activité protéolytique de l'élastase du neutrophile dans le poumon par OMRI nécessite la visualisation du nitroxyde substrat spécialement conçu pour être spécifique de l'enzyme. S'est posée la question de la possibilité de créer un effet Overhauser suffisant pour atteindre l'objectif, et un certain nombre d'expériences de contrôle avec des nitroxydes témoins à 3 raies RPE ont été réalisées. Ces nitroxydes, négativement chargés, neutres ou positivement chargés ont été instillés à différentes concentrations et observés par OMRI. A ce propos, on notera la mise en place pendant ce travail d'un protocole d'instillation intra-trachéale qui permet d'inoculer un volume reproductible de solution de nitroxyde dans les poumons.

De ces expériences de contrôle, il ressort que la détection des nitroxydes est très variable selon leur nature : les molécules carboxylées semblent les mieux à même d'être détectées, au contraire des nitroxydes neutres ou aminés. Ce résultat pourrait être expliqué par l'absence apparente d'expression de transporteurs d'anions organiques dans les poumons d'origine humaine, de rat, ou de souris, au contraire des transporteurs de cations organiques (Bosquillon, 2010). De plus, la présence de surfactant alvéolaire, qui est constitué de phospholipides, pourrait favoriser l'adsorption de nitroxydes neutres, lesquels pourraient voir leur spectre RPE s'élargir fortement en cas d'immobilisation. Pour revenir aux nitroxydes les plus visibles par OMRI, les concentrations instillées doivent être élevées (supérieure à 5 mM) pour une détection basée sur l'augmentation du signal, ce qui suggère, même dans le cas des nitroxydes les plus favorables, une disparition rapide des sondes dans l'environnement pulmonaire. Ceci nous a conduits à examiner, outre les images de magnitude, les images de phase où l'on peut détecter un retournement de phase en même temps qu'une extinction du signal (quasi-annulation de l'aimantation des spins protoniques) parfois observable dans l'ensemble des poumons. Ceci indique la présence de faibles concentrations de nitroxydes, inférieures à 100  $\mu\text{M}$ , au regard de ce qui a été instillé. Ainsi, dans tous les cas observés, on ne peut exclure l'hypothèse d'internalisation intracellulaire de ces nitroxydes, *a fortiori* leur métabolisation qui réduirait la fonction nitroxyde. Ces observations sont en accord avec l'impossibilité d'observer dans les poumons par OMRI le nitroxyde cétonique qui est le produit de l'hydrolyse de l'ester d'énol, même instillé à concentration élevée. Les lavages broncho-alvéolaires correspondant à ces expériences ont montrés par RPE la disparition en quelques minutes de ce composé, ce qui suggère des mécanismes très efficaces quant à son élimination de l'environnement pulmonaire. Ces observations ont constitué un coup dur au projet d'observation de l'activité de l'élastase *in vivo* dans le poumon en situation inflammatoire par visualisation directe de la cétone. En fin de travail de thèse, nous nous sommes donc tournés vers le substrat de la réaction

enzymatique, qui est visible dans les poumons sains par OMRI, et dont sa disparition dans les poumons est plus rapide en présence d'élastase du neutrophile qu'en son absence. Les résultats montrent que l'effet Overhauser à la fréquence RPE du substrat instillé à 25 mM disparaît en quelques minutes du champ de vue, même en imagerie de phase, lorsque les poumons sont en situation inflammatoire induite par le LPS. La cinétique de disparition du substrat est un indicateur de la présence d'enzyme, ce qui constitue un pis-aller honorable pour l'imagerie moléculaire de l'inflammation pulmonaire.

Une alternative plus crédible serait un substrat et surtout une cétone possédant une fonction carboxyle. En effet, il est fort probable que cette fonction, anionique à pH=7 permettrait la rémanence du produit de la réaction enzymatique dans le poumon et son observation directe par OMRI. Cependant, l'introduction d'un tel groupement nécessite de repenser la synthèse organique du nitroxyde, ce qui, aux dires des collègues chimistes de l'UMR7273 à Marseille, représente au mieux des mois de travail. Cette alternative n'a pas pu être envisagée lors du présent travail.

## 5.4. Difficultés rencontrées

Les résultats obtenus lors de ce travail peuvent apparaître comme en deçà de ce qui pouvait être attendu, notamment en termes de développement de l'OMRI des poumons de souris. On peut rendre compte de ce relatif insuccès par un certain nombre de difficultés rencontrées

Un premier écueil provient du système d'acquisition lui-même : il s'agit d'un système MRI-Tech, acquis en 2015 à très bas coût, qui disposait d'une électronique d'acquisition basée sur une plateforme National Instruments qui date d'une dizaine d'année environ, la gestion de fichiers étant assurée par le système d'exploitation Window-7. La programmation des séquences est en partie effectuée sous Python qui permet de manière ouverte les calculs des amplitudes de gradient. Toutefois, le code source d'un certain nombre de routines compilées par le constructeur n'est pas accessible. Par ailleurs, la gestion de la partie séquençage (chronogramme), notamment en ce qui concerne la question des boucles et des registres comportant l'ensemble des amplitudes de gradients, est opérée dans un langage PSL (Property Specification Language) dont le constructeur ne nous a pas donné les caractéristiques. Le fichier PSL crée les registres qui sont lus par le séquenceur lors du lancement de l'acquisition. Lors du développement de la séquence UTE3D, nous avons dû, lors d'une démarche "essai-erreur", manipuler le fichier PSL pour le calcul de registres compatibles avec le plus grand nombre de trajectoires possibles. Malheureusement, celui-ci est limité à 845, limite imposée par un écrasement des données des registres pour un nombre plus grand. Pour l'acquisition de grandes matrices, ceci impose d'acquérir séparément une succession d'images avec des coordonnées de trajectoires préalablement déclarées, avec un délai d'au moins 15 secondes entre les acquisitions. Ce trait "besogneux" relatif à l'acquisition est répercuté lors du traitement des données où toutes les matrices doivent être rassemblées en une seule avant le remaillage. Malgré l'aide demandée au constructeur, aucune réponse n'a été donnée à ce jour.

Une autre difficulté a concerné les amplificateurs de gradient. Lors de l'acquisition, un seul amplificateur délivrait le courant nécessaire pour les trois canaux, X, Y et Z. En utilisation maximale, le courant est de 110 A environ pour chaque axe. Le système d'origine n'avait pas la capacité de produire de telles intensités pour des cycles utiles supérieurs à 25%. Ainsi, la valeur du TR des séquences développées était allongée pour éviter la surcharge. Cela nous a fortement limité pour diminuer au mieux les durées d'acquisition des images en présence d'irradiation hyper-fréquence. De plus, un problème électrique majeur dans le bâtiment hébergeant le système est survenu pendant que le système était au repos : l'alimentation de puissance de l'amplificateur de gradient a été gravement endommagée,

occasionnant un délai de plusieurs mois en 2018 avant son remplacement et donc un arrêt complet des expériences. Compte tenu de la fragilité de cette alimentation, il a été décidé de remplacer toute la chaîne d'amplification des gradients par un système à trois canaux indépendant IECO (Helsinki, Finlande) de bien meilleure facture. Cependant, l'installation en 2019 et la mise en ordre de marche a également entamé l'emploi du temps des expériences prévues, notamment sur les souris en situation inflammatoire.

Bien que ce type de problèmes soit le lot commun des expérimentateurs dans le domaine de l'IRM préclinique, force est de constater que le système MRI-Tech, à la stabilité approximative, n'a pas été un élément facilitateur de la présente étude.

### 5.5. Développements ultérieurs : vers l'imagerie chez l'humain

On ne peut manquer de se poser la question de la pertinence de l'OMRI moléculaire de la protéolyse à 0,19T : cette induction impose une fréquence RPE de 5,4 GHz, confinant ainsi les applications de cette approche à la souris, pour des questions de profondeur de pénétration. Ce point est marginal tant que l'on ne s'adresse qu'aux applications précliniques de l'OMRI de la protéolyse : en effet un effort substantiel doit être consenti pour montrer la validité d'une telle approche, notamment pour démontrer la capacité d'inhibiteurs de protéases dans les pathologies inflammatoires, fussent-elles murines. Mais dans un but plus axé vers les pathologies humaines, l'OMRI à 0,2T n'est plus applicable et on doit se tourner vers des champs beaucoup plus faibles pour permettre l'irradiation RPE dans le domaine des radiofréquences.

Si l'on calcule les énergies des états de spin de l'électron dans un nitroxyde à trois raies ou à six raies (Elodie Parzy, RMSB, résultats non publiés), on peut déterminer que l'effet Overhauser à champ très faible (200  $\mu$ T ou moins) peut être très intense avec des facteurs d'amplification du signal d'un facteur 100 ou plus à champ terrestre (47  $\mu$ T à Bordeaux). Ainsi, dans des expériences préliminaires à champ terrestre, la détection du signal de RMN de l'eau d'un flacon de 250 mL d'eau en présence de 1mM de nitroxyde à trois raies ou à six raies a pu être mesuré en quelques minutes par effet Overhauser (P. Massot, J.M. Franconi, résultats non publiés), ce qui n'est pas envisageable sans rehaussement. Ce phénomène n'est possible que grâce au couplage hyperfin observable dans les nitroxydes, qui donne des termes non diagonaux dans l'Hamiltonien de l'électron et ainsi la présence de transitions RPE même à champ nul. Les fréquences RPE utilisables à champ terrestre pour générer l'effet Overhauser sont de l'ordre de 70 MHz pour un nitroxyde à trois raies et de 150 MHz pour notre nitroxyde cétonique à 6 raies. En jouant sur la constante de couplage électron-phosphore, on peut espérer réduire significativement cette fréquence et ainsi rendre l'irradiation RPE quasiment inoffensive pour l'OMRI chez l'humain. Il est ainsi envisageable, à condition de fabriquer un instrument *ad hoc* "corps-entier" à champ très faible et qui possède des gradients d'induction sur les trois axes de l'espace, de mesurer l'activité protéolytique sur gros animal. Pour transférer cette approche chez l'homme, les nitroxydes devront montrer leur innocuité et devront faire l'objet d'une autorisation. Un tel projet nécessitera une forte synergie entre instrumentistes, méthodologistes RMN et chimistes/pharmacologistes.

## 6. Annexe

## 6.1. Protocole d'instillation intra trachéale

### Matériels :

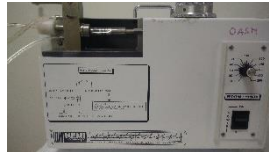
Pipette



Cathéter de perfusion rose 20G (1.10 x 32mm) TERUMO SURFLO



Respirateur : 60 resp / min et 0,3 cc



Plateforme d'intubation ayant une inclinaison de 80° par rapport à la verticale



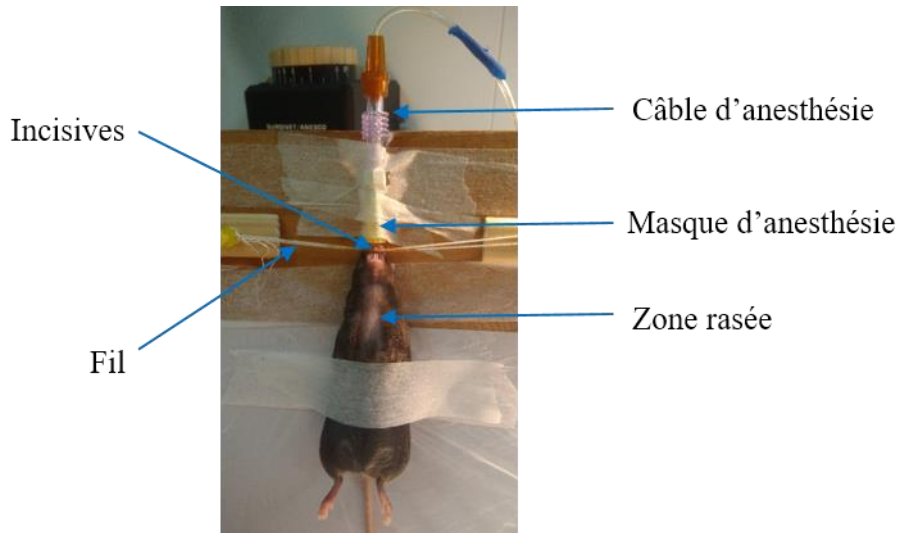
Solution de nitroxyde V=70 µL

Lampe torche

Spatule

### Procédure :

1. Prélever maximum 70 µL (au-delà la souris peut ne pas survivre à l'instillation) de cétone avec la pipette.
2. Placer une souris dans la chambre d'anesthésie et l'anesthésier avec un mélange isoflurane / air de **5%**. Après une courte exposition à l'isoflurane (fréquence respiratoire à environ 50 resp / min), vérifier que l'animal est bien anesthésié par l'absence de réflexes après pincement des orteils.
3. Installer la souris sur la plate-forme d'intubation comme il est montré sur la photo. Fixer la souris en accrochant ses incisives au fil. Insérer le museau dans le masque d'anesthésie. Scotcher le bas du buste et les pattes avant de la souris (sans la comprimer) à la plate-forme d'intubation afin qu'elle reste en place durant la manipulation.



4. Réduire l'isoflurane à 2% pour maintenir la sédation.

5. Raser le cou de la souris avec une tondeuse. Placer une lampe torche en face de la zone rasée. Se positionner debout derrière la plateforme.


Arrière

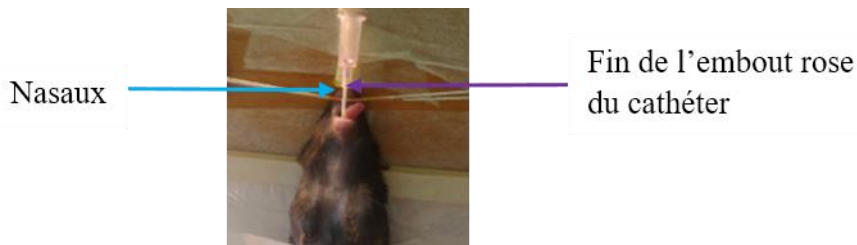
Tirer la langue de la souris et la maintenir à l'extérieur afin de visualiser par transparence l'ouverture / fermeture des cordes vocales.



Avant

Pour plus de visibilité, s'aider d'une spatule.

6. Courber légèrement le cathéter . L'introduire vers l'avant jusqu'à une profondeur de 10 mm environ dans la trachée, tout en faisant de légers massages le long de la trachée. Lorsque le cathéter est en place, la fin de l'embout rose se trouve au niveau des nasaux.



7. Vérification de l'intubation : **cette étape est compliquée mais très importante.**

Fixer le cathéter au respirateur → la respiration de la souris doit suivre le cycle imposé par le respirateur, cependant pour certaine souris, il est difficile de voir cet effet. Placer



un doigt sur l'estomac et si vous sentez qu'il suit le respirateur, retirer immédiatement le cathéter, vous êtes dans l'œsophage.

**Ne pas procéder aux étapes suivantes si la confirmation de l'intubation n'est pas établie.**

8. Maintenir le cathéter en place dans la trachée et le débrancher du respirateur. A l'aide de la pipette, déposer les 70  $\mu$ L de nitroxyde dans l'embout rose du cathéter.
9. Connecter le cathéter au respirateur durant 15 secondes pour être sûr qu'il n'y ait pas de liquide coincé dans la trachée.

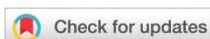
## 6.2. Homolyse de l'alkoxyamine

En 2014, des agents théranostiques ont été conçus pour le diagnostic et le traitement de tumeur. Ces sondes intelligentes sont des alkoxyamines qui sous l'action spécifique d'enzymes, s'activent, s'homolysent et génèrent deux types de radicaux dans les tumeurs, un radical alkyle létal et un nitroxyde stable SG1. Tout comme il a été possible de tirer parti de l'activité protéolytique pour l'étude de l'hydrolyse du substrat en OMRI, il en est de même pour l'étude de l'activité enzymatique liée à la libération du SG1 sur le site tumoral.

L'alkoxyamine a été marqué à un peptide Suc-Ala-Ala-Pro-Phe et l'homolyse *in vitro* a été étudiée par spectroscopie RPE et par OMRI. Des résultats probants montrant une nette spécificité des enzymes chymotrypsines et subtilisines A pour le substrat et un fort rehaussement de signal OMRI dû à l'homolyse de l'alkoxyamine suite à son activation, ont été obtenus.

En conclusion l'imagerie moléculaire de cet agent théranostique dans l'environnement tumoral pourrait être surveillée par OMRI. Cependant, des améliorations devront être apportées afin de limiter la diffusion de ce pro médicament hors du site cible. De plus une diversification de la séquence peptide pourrait être un plus afin de cibler un plus large éventail de protéase associé aux tumeurs, comme les MMP.

## RESEARCH ARTICLE

View Article Online  
View Journal

Cite this: DOI: 10.1039/c9qo00899c

## Enzymatic triggering of C–ON bond homolysis of alkoxyamines†

Gérard Audran,<sup>a</sup> Lionel Bosco,<sup>a</sup> Paul Brémond,<sup>b</sup> Natacha Jugniot,<sup>c</sup> Sylvain R. A. Marque,<sup>b</sup> Philippe Massot,<sup>c</sup> Philippe Mellet,<sup>\*c,d</sup> Tataye Moussounda Koumba,<sup>a</sup> Elodie Parzy,<sup>c</sup> Angélique Rivot,<sup>c</sup> Eric Thiaudière,<sup>c</sup> Pierre Voisin,<sup>c</sup> Carina Wedl<sup>a</sup> and Toshihide Yamasaki<sup>a</sup>Received 16th July 2019.  
Accepted 9th September 2019  
DOI: 10.1039/c9qo00899c  
rsc.li/frontiers-organicAlkoxyamine **1** is selectively hydrolyzed by chymotrypsin and subtilisin A into alkoxyamine **2H+** for which C–ON bond homolysis occurred with a 4-fold increase in rate constants compared to **1** while non-specific proteases had no effect. This highlights the triggering effect of enzymes. This is a proof of concept for a theranostic approach for treating solid tumors using enzyme-activated alkoxyamines releasing a cytotoxic alkyl radical and a stable nitroxide as a contrast agent for Overhauser-enhanced MRI.

## Introduction

Alkoxyamines are currently used as initiators/controllers for Nitroxide Mediated Polymerization (NMP),<sup>1–3</sup> as tin-substitutes for tin free radical chemistry,<sup>4,5</sup> and as key-stone molecules for smart materials.<sup>6–9,10–12</sup> A few years ago, we devised the concept (Fig. 1) for the use of alkoxyamines as theranostic agents<sup>13</sup> for treating tumors. Using poorly activated and non-selective alkoxyamines, their potential as theranostic agents was highlighted *in vitro* on cell culture.<sup>13,14</sup> A key step for further development of this family of molecules as drugs is the selective activation using specific enzyme activities. Enzymatic activation of the C–ON bond homolysis of alkoxyamines affords a high selectivity in the therapeutic effect of alkoxyamines because tumors exhibit a specific and persistent enzymatic activity. Thus, homolysis of alkoxyamines would be triggered only in tumors without a detrimental effect on healthy tissues due to the generation of lethal alkyl radicals. Furthermore, this specific mode of activation is monitored by

OMRI since the enzymatic activity in the tumor environment leads to the release of a stable nitroxide from alkoxyamine homolysis.

Herein, we have described the synthesis of the first peptide labelled alkoxyamine according to **1** specific of chymotrypsin-like enzymes which released alkoxyamine **2** activated by spontaneous protonation affording the labile alkoxyamine **2H+** (Chart 1) at physiological pH. Kinetics, enzyme specificities

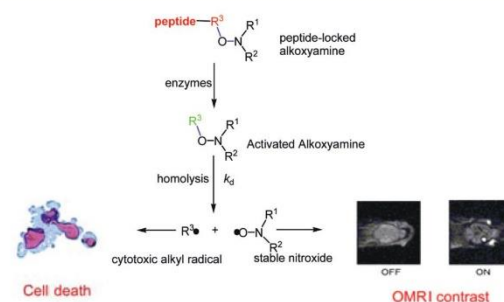


Fig. 1 Concept for the application of alkoxyamines as theranostic agents.  $k_d$ , rate constant for the C–ON bond homolysis.

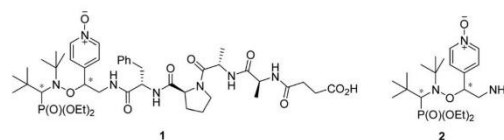


Chart 1 Targeted alkoxyamines.

<sup>a</sup>Aix Marseille Univ, CNRS, ICR, UMR 7273, Case 551, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille Cedex 20, France. E-mail: g.audran@univ-amu.fr, sylvain.marque@univ-amu.fr

<sup>b</sup>Aix Marseille Univ, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille, France

<sup>c</sup>Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR 5536 CNRS, Case 93, University of Bordeaux 146 rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. E-mail: philippe.mellet@rmsb.u-bordeaux.fr

<sup>d</sup>INSERM, 33076 Bordeaux Cedex, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Characterization of compounds **1**, **2**, and **5–11**,  $pK_a$  and kinetic measurements, intramolecular H-bonding, and XRD files for *RR/SS-8* and *RS/SR-8*, and kinetic data. CCDC 1880849 and 1880850. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c9qo00899c

and activities as well as pH-dependence of the homolysis rate constant  $k_d$  (Fig. 1) were investigated. Protected or labelled alkoxyamines such as **1** exhibit clearly lower  $k_d$  values compared to the free alkoxyamine **2** or the activated alkoxyamines **2H**•.

## Experimental section

$^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded using an internal deuterium lock at room temperature using the following instruments: Bruker AC400 (400 MHz) and Bruker AC300 (300 MHz). Data are presented as: chemical shift (in ppm), integration, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, br = broad signal, dd = doublet of doublets, quint. = quintuplet), coupling constant ( $J$  in Hz) and integration.  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  and  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spectra were recorded using Bruker AC300 (121 MHz) and Bruker AC400 (162 MHz) spectrometers with complete proton decoupling. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm using residual non-deuterated solvents as internal references. When reported, carbons are attributed using DEPT methods. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded using a SYNAPT G2 HDMS (Waters) spectrometer equipped with an atmospheric pressure ionization source (API) pneumatically assisted. Samples were ionized by a positive electrospray mode as follows: electrospray tension (ISV): 2800 V; opening tension (OR): 20 V; nebulization gas pressure (nitrogen): 800 L h<sup>-1</sup>. The parent ion ( $\text{M}^+$ ,  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ) is quoted. All experiments were performed under anhydrous conditions and an inert atmosphere of argon and, except where stated, using dried apparatus and employing standard techniques for handling air-sensitive materials. All reagents were weighed and handled in air at room temperature. For EPR measurements, samples with 0.5 mM concentration of nitroxide were prepared in non-degassed solvents. Experiments were performed indifferently using Elexsys, EMX or ER 100D Bruker machines (a difference smaller than 0.1 G was noticed in hyperfine coupling constants). EPR spectra were recorded with a gain of  $2 \times 10^5$  (72 dB for Elexsys), a modulation amplitude of 1.0 G, a sweep width of 150 G, a sweep time of 21 s, and a power of 20 mW as parameters.

### Synthesis of peptide-alkoxyamine **1**

To a solution of **11** (327 mg, 0.31 mmol) in 30 mL DCM at 0 °C, DBU (47  $\mu\text{L}$ , 0.31 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 3 h (until TLC showed completion of reaction). To the mixture, succinic anhydride (34 mg, 0.34 mmol) was added at 0 °C; it was then allowed to rise to room temperature over 6 h. DCM was removed *in vacuo* and the residue was taken up in 10 mL distilled water. The aqueous layer was washed with diethyl ether (3  $\times$  4 mL) and the ether layer was discarded. Removal of water in a lyophilizer, followed by purification in a silica gel column, yielded the desired compound in 72% yield (205 mg, 0.22 mmol). HRMS (ESI) calc. for  $\text{C}_{44}\text{H}_{69}\text{N}_7\text{O}_{12}\text{P}^+$ : 918.4736  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; found: 918.4732.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.24 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 7.48 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H), 7.34–7.20 (m, 4H), 7.16 (t,  $J$  = 8.4

Hz, 2H), 5.16–5.02 (m, 0.6H), 4.93 (dd,  $J$  = 8.9, 4.0 Hz, 0.4H), 4.53 (q,  $J$  = 6.9 Hz, 1H), 4.43–4.07 (m, 8H), 3.98–3.90 (m, 1H), 3.70–3.65 (m, 1H), 3.59–3.47 (m, 2H), 3.43–3.34 (m, 1H), 3.02–2.92 (m, 1H), 2.91–2.80 (m, 1H), 2.67–2.59 (m, 2H), 2.50–2.57 (m, 2H), 2.16–2.04 (m, 1H), 1.96–1.78 (m, 2H), 1.56–1.68 (m, 1H), 1.41–1.27 (m, 11H), 1.21 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 10H), 0.95 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 9H).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  177.3, 175.3, 175.2, 175.0, 173.9, 173.8, 173.5, 173.2, 173.0, 145.8, 139.7, 137.7, 137.5, 130.2, 130.1, 129.6, 129.5, 128.0, 127.9, 126.9, 126.8, 86.0, 70.2, 68.8, 63.7, 63.6, 63.5, 63.3, 63.1, 62.2, 62.1, 62.0, 61.9, 61.6, 55.7, 55.5, 50.3, 49.6, 49.4, 49.2, 49.1, 49.0, 48.8, 48.6, 48.4, 44.4, 38.4, 38.3, 36.4, 36.4, 31.1, 30.8, 30.7, 30.6, 30.2, 30.00, 28.9, 28.8, 25.6, 17.8, 17.0, 16.9, 16.9, 16.7, 16.6, 16.5.  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  as an internal standard)  $\delta$  25.25, 25.00, 0.00 ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).

### 4-(2-Amino-1-((*tert*-butyl(1-(diethoxyphosphoryl)-2,2-dimethylpropyl)amino)oxy)ethyl)pyridine 1-oxide (**2**)

*N*-Oxide *RR/SS-9* (86 mg, 0.163 mmol) was dissolved in MeOH (15 mL) and KOH (274 mg, 4.891 mmol, 30 equiv.) was added at once to the flask. The solution was allowed to stir for 1 day and the reaction was quenched with water. The aqueous phase was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried over  $\text{MgSO}_4$  and the solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was subjected to automatic flash-column chromatography with a gradient of MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  to yield amine *RR/SS-2* (70 mg, 100%) as colorless oil. The reaction was likewise performed for *RS/SR-2* (100 mg, 0.189 mmol) and KOH (319 mg, 5.69 mmol, 30 eq.), yielding 76 mg (90%) of the targeted product. *RS/SR-2*:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.19 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 7.25 (overlapped d, 2H), 4.86 (br s, 1H), 4.40–4.25 (m, 1H), 4.15–3.95 (m, 3H), 3.36 (d,  $J$  = 26.9 Hz, 1H), 3.35–3.17 (m, 2H), 1.36 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H), 1.33 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H), 1.21 (s, 9H), 0.94 (s, 9H).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  141.3 (C), 138.8 (2  $\times$  CH), 125.3 (2  $\times$  CH), 88.3 (CH), 69.0 (d,  $J$  = 139 Hz, CH), 62.0 (C), 61.5 (d,  $J$  = 7.2 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 59.6 (d,  $J$  = 7.2 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 46.3 ( $\text{CH}_2$ ), 35.7 (d,  $J$  = 5.5 Hz, C), 30.3 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 3  $\times$   $\text{CH}_3$ ), 28.6 (3  $\times$   $\text{CH}_3$ ), 16.7 (d,  $J$  = 5.5 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 16.3 (d,  $J$  = 6.6 Hz,  $\text{CH}_3$ ).  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  25.3. HRMS (ESI) calc for  $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_5\text{P}^+$ : 432.2622  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; found: 432.2623. *RR/SS-2*:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.16 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 7.42 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 4.99 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 4.06–3.81 (m, 2H), 3.81–3.30 (m, 3H), 3.41 (d,  $J$  = 26.9 Hz, 1H), 2.90 (br s, 1H), 1.25 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 1.18 (s, 9H), 1.18 (s, 9H), 1.04 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  139.4 (C), 138.7 (2  $\times$  CH), 126.11 (2  $\times$  CH), 82.2 (CH), 69.3 (d,  $J$  = 140 Hz, CH), 61.7 (C), 61.3 (d,  $J$  = 6.6 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 59.2 (d,  $J$  = 7.2 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 44.08 ( $\text{CH}_2$ ), 35.2 (d,  $J$  = 4.4 Hz, C), 30.7 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3  $\times$   $\text{CH}_3$ ), 27.9 (3  $\times$   $\text{CH}_3$ ), 16.2 (d,  $J$  = 6.1 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 16.1 (d,  $J$  = 6.6 Hz,  $\text{CH}_3$ ).  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  24.1. HRMS (ESI) calc for  $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_5\text{P}^+$ : 432.2622  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; found: 432.2623.

### 2,2,2-Trifluoro-*N*-(2-(pyridin-4-yl)ethyl)acetamide (**5**)

2-(Pyridin-4-yl)ethanamine<sup>15</sup> **4** (2.00 g, 16.37 mmol) was diluted in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL) and pyridine (1.45 mL, 18.01 mmol, 1.1 eq.) was added. The reaction mixture was



cooled to 0 °C and 2,2,2-trifluoroacetic anhydride (2.31 mL, 16.37 mmol, 1 eq.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) was added slowly *via* a dropping funnel. The reaction was allowed to stir for 2 h and was then quenched with NaHCO<sub>3</sub> sat. Solid NaHCO<sub>3</sub> was added to adjust the mixture to pH 9. Then, the solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was recrystallized with petroleum ether/toluene to yield trifluoroacetamide 5 (3.19 g, 89%) as a slightly yellowish solid (m.p. = 97 °C). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.50 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 6.79 (s, 1H), 3.66 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.92 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 157.8 (q, *J* = 37 Hz, C), 149.6 (2 × CH), 147.8 (C), 124.4 (2 × CH), 116.0 (q, *J* = 288 Hz, C), 40.4 (CH<sub>2</sub>), 34.5 (CH<sub>2</sub>). <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -75.9. HRMS (ESI) calc for C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub><sup>+</sup>: 219.0740 [M + H]<sup>+</sup>; found: 219.0739.

#### *N*-(2-Bromo-2-(pyridin-4-yl)ethyl)-2,2,2-trifluoroacetamide (6)

Trifluoroacetamide 5 (5.00 g, 22.92 mmol), *N*-bromosuccinimide (8.16 g, 45.83 mmol, 2 eq.) and NaHCO<sub>3</sub> (7.70 g, 91.67 mmol, 4 eq.) were dissolved in CHCl<sub>3</sub> (250 mL). The mixture was set under argon, refluxed and irradiated with a 300 W UV-lamp, installed close to the flask. The solution turned red and the reaction was stopped when the red color vanished. The solution was then stopped and washed with NaHCO<sub>3</sub> sat. and the aqueous phases were extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were washed with water, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was subjected to automatic flash-chromatography with a gradient of acetone in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to yield bromide 6 (1.02 g, 15%) as a brownish oil. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.64 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 6.89 (s, 1H), 5.04 (dd, *J* = 8.6, 5.5 Hz, 1H), 4.07–3.98 (m, 1H), 3.91–3.83 (m, 1H). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 157.7 (q, *J* = 38.0 Hz, C), 150.0 (2 × CH), 147.7 (C), 122.8 (2 × CH), 115.8 (q, *J* = 288 Hz, C), 48.3 (CH), 46.7 (CH<sub>2</sub>). <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -75.8. HRMS (ESI) calc for C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Br<sup>+</sup>: 296.9845 [M + H]<sup>+</sup>; found: 296.9845.

#### Diethyl(1-(*tert*-butyl(1-(pyridin-4-yl)-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)ethoxy)amino)-2,2-dimethylpropyl)phosphonate (7)

To a suspension of CuBr (861 mg, 6.0 mmol, 0.6 equiv.) and Cu powder (763 mg, 12.0 mmol, 1.2 eq.) in degassed benzene (30 mL) under argon was added *N,N,N',N''*-pentamethyldiethylenetriamine (1.25 mL, 6.0 mmol, 0.6 eq.). After stirring for 10 min, a solution of nitroxide SG1 (3.24 g, 11.0 mmol, 1.1 equiv.) and bromide 6 (2.97 g, 10.0 mmol, 1 eq.) in degassed benzene (30 mL) was transferred into the first solution. The mixture was allowed to stir for 12 h. The solution was diluted with EtOAc, quenched and washed with 50% (v/v) aq. ammonia solution, NaHCO<sub>3</sub> sat. and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product with a 1 : 1 (*RR/SS*):(*RS/SR*) diastereomeric ratio (<sup>31</sup>P NMR ratio) was purified by automatic flash-chromatography with a gradient of acetone in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to give (*RS/SR*)-7 (1.7 g) and (*RR/SS*)-7 (2.24 g) as colourless oils, corresponding to a

total yield of 3.94 g (77%). (*RS/SR*)-7: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.92 (s, 1H), 8.56 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 5.03 (br s, 1H), 4.40–4.28 (m, 1H), 4.25–4.13 (m, 2H), 4.12–4.02 (m, 1H), 3.98–3.84 (m, 2H), 3.42 (d, *J* = 28.1 Hz, 1H), 1.42 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.37 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.24 (s, 9H), 1.01 (s, 9H). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 157.2 (q, *J* = 37 Hz, C), 149.5 (2 × CH), 148.3 (C), 121.4 (2 × CH), 115.9 (q, *J* = 288 Hz, C), 86.10 (CH), 67.6 (d, *J* = 140 Hz, CH), 62.5 (C), 61.5 (d, *J* = 7.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 60.4 (d, *J* = 7.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 43.3 (CH<sub>2</sub>), 35.5 (d, *J* = 5.0 Hz, C), 30.6 (d, *J* = 6.1 Hz, 3 × CH<sub>3</sub>), 16.3 (d, *J* = 5.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.9 (d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 25.6. <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -75.6. HRMS (ESI) calc for C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>P<sup>+</sup>: 512.2496 [M + H]<sup>+</sup>; found: 512.2498.

(*RR/SS*)-7: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.56 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H), 7.37 (br s, 1H), 7.36 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 5.24 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.23–4.12 (m, 1H), 4.03–3.85 (m, 2H), 3.69–3.60 (m, 1H), 3.57–3.40 (m, 2H), 3.46 (d, *J* = 26.6 Hz, 1H), 1.27–1.22 (m, 12H), 1.22 (s, 9H), 1.03 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 157.4 (q, *J* = 37 Hz, C), 149.5 (2 × CH), 148.1 (C), 122.9 (2 × CH), 115.9 (q, *J* = 288 Hz), 79.6 (CH), 69.6 (d, *J* = 140 Hz, CH), 62.4 (C), 61.5 (d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 59.7 (d, *J* = 7.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 43.8 (CH<sub>2</sub>), 35.2 (d, *J* = 4.4 Hz, C), 30.8 (d, *J* = 6.1 Hz, 3 × CH<sub>3</sub>), 28.1 (3 × CH<sub>3</sub>), 16.2 (d, *J* = 6.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.1 (d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 23.9. <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H} NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -75.7. HRMS (ESI) calc for C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>P<sup>+</sup>: 512.2496 [M + H]<sup>+</sup>; found: 512.2498.

#### Diethyl(1-(2-amino-1-(pyridin-4-yl)ethoxy)(*tert*-butylamino)-2,2-dimethylpropyl)phosphonate (8)

Alkoxyamine *RS/SR*-7 (180 mg, 0.433 mmol) was dissolved in MeOH (10 mL) and KOH (729 mg, 13.0 mmol, 30 equiv.) was added. The mixture was allowed to stir for 5 days. Then, the reaction was quenched with water. The aqueous phase was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by automatic flash-chromatography. Amine *RS/SR*-8 (133 mg, 91%) was obtained as colorless oil, which crystallized (m.p. = 86 °C) with diethyl ether in a fridge. The reaction was likewise performed for *RR/SS*-7 (293 mg, 0.573 mmol) and KOH (964 mg, 17.184 mmol, 30 eq.), yielding 180 mg (76%) of *RR/SS*-8 as a colourless oil which co-crystallized (m.p. = 92 °C) with diethyl ether in the refrigerator. *RS/SR*-8: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.59 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.91 (br s, 1H), 4.40–4.29 (m, 1H), 4.20–3.95 (m, 3H), 3.38 (d, *J* = 27.0 Hz, 1H), 3.29 (br s, 2H), 1.38 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.23 (s, 9H), 0.92 (s, 9H). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 149.6 (C), 148.9 (2 × CH), 122.0 (2 × CH), 88.0 (CH), 68.1 (d, *J* = 139 Hz, CH), 61.2 (C), 61.0 (CH<sub>2</sub>), 58.9 (d, *J* = 7.3 Hz, CH<sub>2</sub>), 45.8 (br s, CH<sub>2</sub>), 35.0 (d, *J* = 5.1 Hz, C), 29.6 (d, *J* = 5.1 Hz, 3 × CH<sub>3</sub>), 27.8 (3 × CH<sub>3</sub>), 16.0 (d, *J* = 5.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.5 (d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 25.6. HRMS (ESI) calc for C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>P<sup>+</sup>: 416.2673 [M + H]<sup>+</sup>; found: 416.2673. *RR/SS*-8: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.58 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 5.01 (dd, *J* = 3.5 Hz, 9.2 Hz, 1H), 4.03–3.82 (m, 2H), 3.68 (dd, *J* =



3.5 Hz, 12.8 Hz, 1H), 3.56–3.31 (m, 2H), 3.42 (d,  $J = 26.4$  Hz, 1H), 2.94 (dd,  $J = 9.5$  Hz, 12.7 Hz, 1H), 1.24 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.21 (s, 9H), 1.20 (s, 9H), 0.97 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  149.7 (2  $\times$  CH), 149.2 (C), 123.6 (2  $\times$  CH), 83.4 (CH), 69.6 (d,  $J = 140$  Hz, CH), 61.9 (C), 61.6 (d,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 59.2 (d,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 44.6 ( $\text{CH}_2$ ), 35.4 (d,  $J = 4.4$  Hz, C), 30.9 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3  $\times$   $\text{CH}_3$ ), 28.1 (3  $\times$   $\text{CH}_3$ ), 16.3 (d,  $J = 6.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 16.2 (d,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  24.2. HRMS (ESI) calc for  $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_4\text{P}^+$ : 416.2673  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; found: 416.2673.

#### 4-((*tert*-Butyl(1-(diethoxyphosphoryl)-2,2-dimethylpropyl)amino)oxy)-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)ethylpyridine 1-oxide (9)

Trifluoroacetamide (*RR/SS*)-7 (500 mg, 0.977 mmol) was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) and 77% *m*-CPBA (263 mg, 1.17 mmol, 1.2 eq.) was added at once to the solution. The solution was allowed to stir for 30 min and then quenched and washed with 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  solution and  $\text{NaHCO}_3$  sat. The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$  and the solvents were evaporated *in vacuo*. The crude product was purified by flash-column chromatography with a gradient of MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  to yield *N*-oxide (*RR/SS*)-9 (515 mg, quant.) as a colorless oil. The reaction was likewise performed for (*RS/SR*)-9 (500 mg, 0.977 mmol) and 77% *m*-CPBA (263 mg, 1.17 mmol, 1.2 eq.), yielding 515 mg (quant.) of the desired product. (*RS/SR*)-9:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.97 (br s, 1H), 8.16 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 7.16 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 5.03 (br s, 1H), 4.34–4.23 (m, 1H), 4.23–4.02 (m, 2H), 4.12–4.02 (m, 1H), 3.96–3.84 (m, 2H), 3.42 (d,  $J = 28.2$  Hz, 1H), 1.40 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.37 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.23 (s, 9H), 1.02 (s, 9H).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  157.3 (q,  $J = 37$  Hz, C), 138.8 (2  $\times$  CH), 138.6 (C), 124.0 (2  $\times$  CH), 115.9 (q,  $J = 288$  Hz, C), 85.0 (CH), 67.7 (d,  $J = 140$  Hz, CH), 62.7 (C), 61.5 (d,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 60.6 (d,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 43.0 ( $\text{CH}_2$ ), 35.5 (d,  $J = 5.0$  Hz, C), 30.7 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3  $\times$   $\text{CH}_3$ ), 27.8 (3  $\times$   $\text{CH}_3$ ), 16.4 (d,  $J = 5.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 16.0 (d,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  25.2.  $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$  NMR (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -75.6. HRMS (ESI) calc for  $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_6\text{F}_3\text{P}^+$ : 528.2445  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; found: 528.2447. (*RR/SS*)-9:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.09 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 7.6 (br s, 1H), 7.40 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 5.22 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 4.27–4.17 (m, 1H), 4.06–3.88 (m, 2H), 3.70–3.47 (m, 3H), 3.46 (d,  $J = 26.6$  Hz, 1H), 1.03 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 1.23 (s, 9H), 1.20 (s, 9H), 1.10 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  157.2 (q,  $J = 37$  Hz, C), 139.3 (C), 137.6 (2  $\times$  CH), 125.7 (2  $\times$  CH), 115.5 (q,  $J = 288$  Hz, C), 78.1 (CH), 68.9 (d,  $J = 141$  Hz, CH), 61.7 (C), 60.8 (d,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 59.1 (d,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 42.6 ( $\text{CH}_2$ ), 34.8 (d,  $J = 3.9$  Hz, C), 30.3 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3  $\times$   $\text{CH}_3$ ), 27.6 (3  $\times$   $\text{CH}_3$ ), 15.8 (d,  $J = 5.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 15.7 (d,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  24.0.  $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$  NMR (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -75.5. HRMS (ESI) calc for  $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_6\text{F}_3\text{P}^+$ : 528.2445  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; found: 528.2447.

#### Preparation of peptide 10

Fmoc-A-A-OH (711 mg, 1.86 mmol) was added to a stirred solution of P-F-OBn (546 mg, 1.55 mmol) in dichloromethane (10 mL) at 0 °C under an atmosphere of nitrogen. On dis-

solution, 1-hydroxybenzotriazole (251 mg, 1.86 mmol) was added. The solution was stirred at 0 °C for a further 15 min, and then DCC (384 mg, 1.86 mmol) was added in one portion. The mixture was allowed to warm to room temperature over the course of 18 h and filtered, and the filtrate was evaporated *in vacuo*. The residue was taken up in ethyl acetate and filtered, and the filtrate was then washed with 10% aqueous citric acid solution followed by saturated aqueous sodium bicarbonate solution. The combined organic extracts were dried and evaporated *in vacuo* to leave the crude tetrapeptide which was passed through a plug of silica and used for the next reaction.

To a solution of Fmoc-A-A-P-F-OBn (944 mg, 1.31 mmol) in MeOH (15 mL) was added 10% Pd/C (130 mg), and the mixture was stirred for 8 h under a hydrogen atmosphere (1 atm). The reaction mixture was filtered through Celite followed by MeOH removal *in vacuo* to yield the benzyl deprotected tetrapeptide Fmoc-A-A-P-F-OH. The crude product was then purified in a silica gel column to yield the desired product in 69% (670 mg, 1.07 mmol) overall yield. HRMS (ESI) calc. for  $\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_7^+$ : 627.2813  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; found: 627.2813.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.02 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 7.88 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.74–7.66 (m, 3H), 7.50 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 7.41 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.32 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.22 (d,  $J = 8.0$  Hz, 3H), 7.21 (s, 1H), 7.18–7.14 (m, 1H), 4.49 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 4.37–4.19 (m, 5H), 4.09 (t,  $J = 8$  Hz, 1H), 3.60–3.50 (m, 1H), 3.50–3.40 (m, 1H), 3.10–3.0 (m, 1H), 3.0–2.90 (m, 1H), 2.0–1.7 (m, 4H), 1.21 (d,  $J = 8.0$  Hz, 3H), 1.19 (d,  $J = 8.0$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  173.5 (COOH), 172.0 (CONH), 170.9 (2 CONH), 155.6 (OCONH), 143.9 (C, fluorenyl), 143.8 (C, fluorenyl), 140.1 (2C, fluorenyl), 137.9 (C, phenyl), 129.4 (2CH, aromatic), 127.9 (2CH, aromatic), 127.6 (2CH, aromatic), 127.1 (2CH, aromatic), 126.1 (CH, aromatic), 125.3 (2CH, aromatic), 120.1 (2CH, aromatic), 65.6 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 59.4 (CHCOOH), 54.0 (CH), 49.9 (CH), 46.7 (CH), 46.5 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 46.1 (CH), 36.9 ( $\text{CH}_2$ ), 28.6 ( $\text{CH}_2$ ), 24.2 ( $\text{CH}_2$ ), 18.2 (Me), 17.2 (Me).

#### Preparation of peptide-alkoxyamine 11

Fmoc-A-A-P-F-OH 10 (451 mg, 0.72 mmol) and 1-hydroxybenzotriazole (97 mg, 0.72 mmol) were added to a stirred solution of diastereomerically pure *RS/SR*-2 (261 mg, 0.6 mmol) in anhydrous dichloromethane (10 mL) at 0 °C under an atmosphere of nitrogen. On dissolution, EDC·HCl (138 mg, 0.72 mmol) was added. The solution was stirred at 0 °C for a further 30 min. The reaction was quenched with water and the reaction mixture was extracted with DCM. The DCM layer was washed successively with  $\text{NaHCO}_3$  solution, water and brine. The organic extract was dried and evaporated *in vacuo* to leave the crude *N*-oxide tetrapeptide which was purified in a silica gel column to yield the pure product in 75% (471 mg, 0.45 mmol) yield. HRMS (ESI) calc. for  $\text{C}_{55}\text{H}_{75}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{P}^+$ : 1040.5257  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; found: 1040.5259.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  8.98 (d,  $J = 5.4$  Hz, 0.34H), 8.70 (d,  $J = 7.4$  Hz, 0.21H), 8.39 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 8.28–7.98 (m, 1H), 7.85 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.74 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 7.43–7.27 (m, 6H), 7.25–7.08 (m, 5H), 6.97 (d,  $J = 7.6$  Hz, 0.5H), 6.57 (d,  $J = 7.6$  Hz, 0.5H), 5.16–5.01 (m, 1H), 4.63–4.02 (m, 10.5H), 3.85–3.38 (m,



4.5H), 3.08–2.96 (m, 1H), 2.84–2.72 (m, 1H), 2.28–2.08 (m, 1H), 2.00–1.75 (m, 3H), 1.46–1.29 (m, 9H), 1.29–1.13 (m, 11H), 1.13–0.98 (m, 10H).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (101 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  major isomer: 172.4 (CONH), 170.4 (CONH), 170.2 (CONH), 170.0 (CONH), 155.7 (OCONH), 144.3 (C, fluorenyl), 144.1 (C, fluorenyl), 141.2 (2C, fluorenyl), 141.2 (C, aromatic), 139.1 (2CH, aromatic), 137.2 (C, aromatic), 129.5 (2CH, aromatic), 127.9 (2CH, aromatic), 127.6 (2CH, aromatic), 126.3 (CH, aromatic), 125.45 (CH, aromatic), 124.1 (CH, aromatic), 119.9 (2CH, aromatic), 85.8, 67.5 (HCP, d,  $J = 139$  Hz), 66.3 (CH<sub>2</sub>); 62.4 (CN), 62.0 (CH<sub>2</sub>O, d,  $J = 7$  Hz), 61.9, 60.35 (CH<sub>2</sub>O, d;  $J = 10$  Hz), 54.1 (CH<sub>2</sub>), 53.4, 47.2, 46.8 (CH<sub>2</sub>), 43.0 (CH<sub>2</sub>), 39.3 (CH<sub>2</sub>), 35.45 (CMe<sub>3</sub>, d,  $J = 5$  Hz), 30.08 (d,  $J = 4$  Hz), 27.9, 27.6, 24.7 (CH<sub>2</sub>), 18.6, 17.1, 16.10 (CH<sub>3</sub>, d,  $J = 4$  Hz), 15.68 (CH<sub>3</sub>, d,  $J = 7$  Hz). Minor isomer: 172.4 (CONH), 172.2 (CONH), 172.0 (CONH), 170.9 (CONH), 155.8 (OCONH), 144.3 (C, fluorenyl), 144.1 (C, fluorenyl), 141.3 (2C, fluorenyl), 138.6 (2CH, aromatic), 137.4 (C, aromatic), 131.4 (C, aromatic), 129.3 (2CH, aromatic), 128.1 (2CH, aromatic), 127.15 (CH, aromatic), 127.1 (CH, aromatic), 127.05 (CH, aromatic), 125.3 (CH, aromatic), 119.9 (2CH, aromatic), 85.75, 68.6 (C–P, d,  $J = 138$  Hz), 66.3 (CH<sub>2</sub>), 62.2, 61.63 (CH<sub>2</sub>O, d,  $J = 4$  Hz), 60.7, 60.5; 59.61 (CH<sub>2</sub>O, d,  $J = 7$  Hz), 53.8, 50.8, 47.1, 46.7, 46.6, 42.9 (CH<sub>2</sub>), 38.3 (CH<sub>2</sub>), 35.39 (CMe<sub>3</sub>, d,  $J = 6$  Hz), 30.02 (d,  $J = 6$  Hz), 28.11, 17.03, 16.15 (CH<sub>3</sub>, d,  $J = 4$  Hz), 15.72 (Me, d,  $J = 4$  Hz).  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz, acetone- $d_6$ , H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> as an internal standard)  $\delta$  25.98, 25.43.

#### Enzymatic activation

All enzymes were of high purity and activity grade and concentrations were measured by weighing the powder. Chymotrypsin and TPCK-treated trypsin were purchased from Worthington (Lakewood, NJ, USA), pancreatic elastase from Elastin Products Company (Owensville, MO, USA) and subtilisin A from Sigma-Aldrich. 0.1 mM of alkoxyamine **3** was mixed with  $8 \times 10^{-5}$  M of each protease in HEPES buffer 50 mM at pH 7.4, 0.15 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.05% Igepal CA-630 (Sigma). Spectra were recorded immediately after mixing.

All samples were loaded in 60  $\mu\text{L}$  (75 mm) capillaries (BLAUBRAND micropipettes). Acquisitions were performed at 37 °C with a temperature controller (BIO-I, NOXYGEN, Germany) fitted to an EMXnano EPR spectrometer (BRUKER, Germany), under the control of the Xenon software (BRUKER). Quantitation of the SG1 nitroxide at each time of the kinetics was done by fitting with the reference spectrum using the Spinfit module of the Xenon software. EPR acquisition parameters were set as follows: all samples were loaded in 60  $\mu\text{L}$  (75 mm) capillaries (BLAUBRAND micropipettes). Acquisitions were performed at 37 °C with a temperature controller (BIO-I, NOXYGEN, Germany) fitted to an EMXnano EPR spectrometer (BRUKER, Germany), under the control of the Xenon software (BRUKER). Quantitation of the SG1 nitroxide at each time of the kinetics was done by fitting with the reference spectrum using the Spinfit module of the Xenon software. EPR acquisition parameters were set as follows:  $B_0 = 3422$  G, sweep width = 100 G; sweep time = 30 seconds, attenuation = 10 dB; delay between scan = 120 s; modulation amplitude = 1 G; gain = 40 dB.

#### Overhauser-enhanced MRI kinetics at 37 °C

**EPR cavity and MRI devices.** As previously described,<sup>33</sup> a Cirrus Open 0.19 T MRI system (MRI Tech, Canada) was equipped with a permanent magnet operating at 0.193 T (8.245 MHz proton frequency). A maximal field-gradient strength was 20 mT m<sup>-1</sup> in the three directions of space.

The EPR cavity, positioned at the center of the magnet has a cylindrical geometry (240 mm diameter and 28 mm width). An opening (28 mm diameter) in the middle of the cavity enabled sample positioning. Its design and mode of operation, Transverse-Electric TE011 mode, was the focus of the development<sup>16,17</sup> in order to minimize the impact of electromagnetic HF field and to limit Eddy currents. The HF amplification channel, including a synthesizer and two specific amplifiers (RPPA, Artigues-près-Bordeaux, France), generated the HF wave. The EPR resonance frequency of the cavity was tuned around 5.459 GHz, according to the third line starting from low field on the EPR spectrum of the nitroxide SG1. The resonant cavity was tuned and matched with the help of a network analyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) at this resonance frequency.

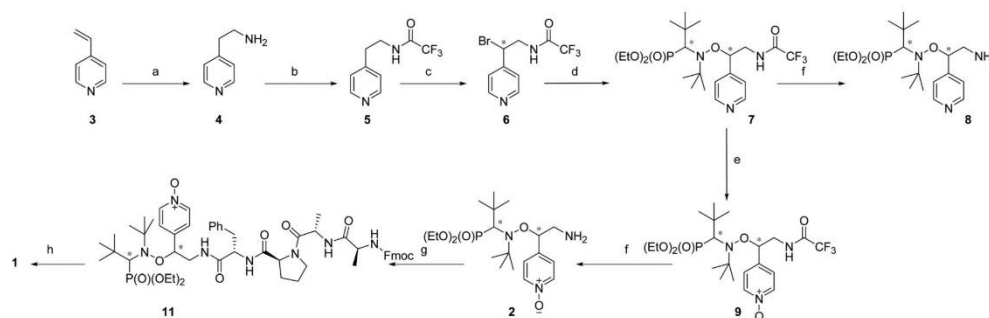
OMRI of proteolysis kinetics was performed by monitoring the product formation in an NMR tube: 1.2 mM of Suc-AAPF-alkoxyamine **1** was mixed with 1.4 mM proxyl (Sigma) and  $8 \times 10^{-5}$  M chymotrypsin (Worthington) in HEPES buffer 50 mM pH = 7.4, 0.15 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.05% Igepal (Sigma). The solution was filled in a 5 mm diameter NMR tube itself centered in a 10 mm tube filled with water. The sample was sealed and put into a 10 mm diameter NMR tube filled with water. A reference was added as a tube of 5 mm of SG-1 2.4 mM added to the phantom. The sample temperature was maintained at 37 °C.

#### Pulse sequence

2D Overhauser-enhanced MRI images were acquired with a gradient echo sequence. EPR saturation started 300 ms before the first NMR RF pulse and was applied throughout the image acquisition. The acquisition parameters were: echo time (TE) = 20 ms; repetition time (TR) = 200 ms; flip angle = 30; receiver bandwidth = 20 kHz; matrix size = 64 × 64; field of view (FOV) = 40 × 40 mm; slice thickness = 5 mm; and acquisition time = 12s. All MR adjustments were done manually, using the same parameters. Signal intensities were measured in the NMR tube region-of-interest, with and without HF irradiation and Overhauser enhancement was calculated and normalized to the Overhauser effect measured in the reference.

## Results and discussion

Peptide labelled alkoxyamine **1** is prepared in 8 steps starting from the commercially available vinyl pyridine **3** (Scheme 1 and ES†). First, addition of ammonia led to **4**,<sup>18</sup> then the amine function was protected as a trifluoroacetamide group<sup>19</sup> to yield **5** which was brominated at the benzylic position using NBS under UV-irradiation to provide **6**. Copper-mediated coup-



**Scheme 1** Preparation of **2** and **1**. (a)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , reflux, 12 h, 56%. (b)  $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ , pyridine,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 2 h, 89%. (c) NBS,  $\text{NaHCO}_3$ , 300 W UV-lamp,  $\text{CHCl}_3$ , reflux, 1 h, 10–20%. (d) SG1, CuBr, Cu, PMDETA, benzene, r.t., 12 h, 77%. (e) *m*-CPBA, DCM,  $0^\circ\text{C}$ , 30 min, 99%. (f) KOH, MeOH, r. t., 24 h, 76–91%. (g) Fmoc-Ala-Ala-Pro-Phe-OH (**10**), 1-hydroxybenzotriazole, *N,N*-diisopropylcarbodiimide,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t., 3 h, 90%. (h) (1) DBU, DCM,  $0^\circ\text{C}$ , 12 h and (2) succinic anhydride,  $\text{NaHCO}_3$ , DCM, r.t., 3 h.

ling of **6** with SG1 afforded alkoxyamine **7** as a 1 : 1 mixture of two diastereoisomers, that were separated by column chromatography. Each diastereoisomer of **7** was deprotected<sup>20</sup> into alkoxyamine **8** which were obtained as single crystals, and their relative configuration determined by X-ray diffraction (see the ESI<sup>†</sup>).<sup>‡</sup> Each diastereoisomer of **7** was also oxidized into **9** and then deprotected to afford alkoxyamine **2**.

Because of the higher  $\text{pK}_a$  value for *RS/SR-2* than that for *RR/SS-2* (*vide infra*), only *RS/SR-2* was then coupled with the beforehand prepared peptide **10** (Fmoc-Ala-Ala-Pro-Phe-OH, Scheme 1 and ESI<sup>†</sup>)<sup>§</sup> to afford **11** which was deprotected using DBU, and functionalized using succinic anhydride to yield peptide-alkoxyamine **1** (Scheme 1). As *RS/SR-2* was racemic and peptide **10** was a single enantiomer, alkoxyamine **1** was obtained as a 1 : 3 mixture of diastereoisomers, which were not possible to separate. Values of  $\text{pK}_a$  for **2**, **7**, and **8** are measured as previously reported (see the ESI<sup>†</sup>)<sup>21–23</sup> and are given as 7.32, 3.96, and 3.40<sup>‡</sup>/7.64 for the *RR/SS* diastereoisomers, respectively, and 7.97, 3.89, and 3.34<sup>‡</sup>/8.05 for the *RS/SR* diastereoisomers, respectively. As expected by the presence of the nitroxyl fragment,<sup>¶</sup> these values of  $\text{pK}_a$  are clearly lower than those generally reported for pyridine or amines. The occurrence of intramolecular H-bonding (IHB) in alkoxyamines is well documented<sup>24–26</sup> and discarded for **2** as confirmed by XRD<sup>||</sup> analysis and <sup>31</sup>P NMR investigations of the solvent effect.<sup>\*\*</sup>

C–ON bond homolysis rate constants  $k_d$  are measured by EPR and  $E_a$  are estimated as previously described (Table 1) and gathered respectively as kinetics in *t*BuPh as organic solvent, kinetics with enzymes, and kinetics in water.<sup>22</sup> In each case,

the concentration of the released nitroxides plateaued at the expected values. In general, small differences in  $E_a$  are observed between diastereoisomers and are ascribed to differences in conformations except for **9** for which a difference of 8.1  $\text{kJ mol}^{-1}$  is observed (Table 1) and for **7H<sup>+</sup>**.<sup>††</sup> Protonation of pyridine in **7/7H<sup>+</sup>** affords a decrease of 6.3  $\text{kJ mol}^{-1}$  for the *RR/SS* diastereoisomer in the expected range ( $\Delta E_a \approx 7.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) reported in the literature.<sup>27</sup> The higher activation for **2** than that for **8** is merely due to the stabilization of the released alkyl fragment as already reported.<sup>27</sup> However, this activation has only a very weak effect on the protonation of the amino groups, that is,  $\Delta E_a \approx -5.1 \text{ kJ mol}^{-1}$  for **2/2H<sup>+</sup>** and  $\Delta E_a \approx -3 \text{ kJ mol}^{-1}$  for **8/8H<sup>+</sup>**.

On the other hand, the protonation of the amino group in **8H<sup>+</sup>** deactivates significantly the pyridyl as the second protonation in **8H2<sup>+</sup>** affords only a gain of ca. 1  $\text{kJ mol}^{-1}$  in sharp contrast to the 10  $\text{kJ mol}^{-1}$  of gain expected from the literature.<sup>27</sup> The effect of the trifluoroacetamide group on  $E_a$  is puzzling as its removal does not show any difference between **7** and **8** ( $\Delta E_a < 1 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), whereas a clear increase of ca. 8.5  $\text{kJ mol}^{-1}$  is observed from **9** to **2**, and a clear decrease in  $E_a$  of ca. 8 and 15  $\text{kJ mol}^{-1}$  from **8** to **2** and **7** to **9**, respectively.<sup>††</sup> Upon protonation in *t*-BuPh, changes in  $E_a$  from **2H<sup>+</sup>** to **8H<sup>+</sup>** and **7H<sup>+</sup>** to **8H<sup>+</sup>** show the same trends compared to the non-protonated homologues. Higher  $E_a$  for **1** than that for **9** is due to the lower electron withdrawing properties of the peptide chain in **1** than those of the trifluoroacetyl group in **9**. At first glance, the solvent effect on  $E_a$  from *t*-BuPh to water/MeOH is weak, *i.e.*, less than 5  $\text{kJ mol}^{-1}$  except for **8H<sup>+</sup>/8H2<sup>+</sup>**,<sup>‡‡</sup> as already reported.<sup>29,30</sup>

<sup>†</sup> For the protonation of the pyridine moiety.

<sup>§</sup> Peptide **10** was prepared using conventional procedures. See the ESI<sup>†</sup>.

<sup>¶</sup>  $\text{pK}_a$  values of **4** are given as 4.41 and 8.53.

<sup>||</sup> CCDC: 1880849 for *RR/SS-8* and 1880850 for *RS/SR-8*.<sup>†</sup>

<sup>\*\*</sup> The difference in chemical shifts between diastereoisomers of **2** is almost constant and smaller than 2 ppm (see the ESI<sup>†</sup>), in good agreement with the non-significant difference in  $E_a$  (less than 1  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) between diastereoisomers.

<sup>††</sup> Accurate and detailed discussion on small changes in  $E_a$  is not within the scope of this communication as not all molecules required for this discussion are available.

<sup>‡‡</sup> The large effect in the solvent effect observed is better ascribed to the intimate ion pair effect which would be observed between the trifluoro acetate anions and **8H<sup>+</sup>** and **8H2<sup>+</sup>**, see ref. 28.

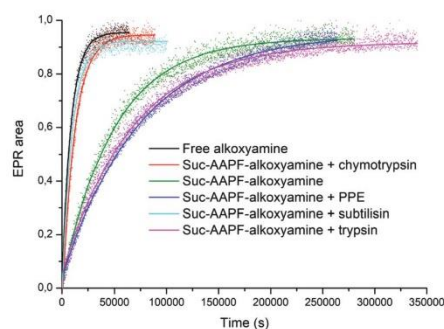


**Table 1** Experimental conditions, activation energies  $E_a$ , re-estimated rate constants  $k_d$  at 120 °C and half-lifetime  $t_{1/2}$  at 37 °C for the C–ON homolysis of alkoxyamines **1**, **2**, and **7–9**

	Conditions	RR/SS			RS/SR		
		$E_a^a$	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}^b$	$E_a^a$	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}^b$
<b>1</b>	<i>t</i> -BuPh	— <sup>c</sup>	— <sup>c</sup>	— <sup>f</sup>	120.2	$2.5 \times 10^{-2}$	6 d
<b>2</b>	<i>t</i> -BuPh	114.6	0.1	16.25 h	116.1	$8.9 \times 10^{-2}$	1.2 d
<b>2H+</b>	<i>t</i> -BuPh + 2 eq. TFA	109.5	0.7	2.5 h	110.6	0.5	1.5 d
<b>7</b>	<i>t</i> -BuPh	123.8	$8.4 \times 10^{-3}$	24.5 d	123.4	$9.5 \times 10^{-3}$	21 d
<b>7H+</b>	<i>t</i> -BuPh + 2 eq. TFA	117.5	$5.8 \times 10^{-2}$	2 d	121.1	$1.9 \times 10^{-2}$	8.5 d
<b>8</b>	<i>t</i> -BuPh	123.0	$1.1 \times 10^{-2}$	17.8 d	123.7	$8.9 \times 10^{-3}$	23 d
<b>8H+</b>	<i>t</i> -BuPh + 1 eq. TFA	119.9	$2.8 \times 10^{-2}$	5.3 d	121.3	$1.8 \times 10^{-2}$	9.2 d
<b>8H2+</b> <sup>d</sup>	<i>t</i> -BuPh + 2 eq. TFA	119.6 <sup>e</sup>	$3.0 \times 10^{-2}$	4.8 d	119.9	$2.8 \times 10^{-2}$	5.3 d
<b>9</b>	<i>t</i> -BuPh	106.1	1.9	36 min	114.2	0.2	14 h
<b>1</b>	H <sub>2</sub> O + pH = 7.4 <sup>f</sup>	— <sup>c</sup>	— <sup>c</sup>	— <sup>c</sup>	113.2	0.2	9.5 h
<b>1</b>	Chymotrypsin <sup>f</sup>	— <sup>c</sup>	— <sup>c</sup>	— <sup>c</sup>	109.3	0.7	2.3 h
<b>1</b>	Subtilisin A <sup>f</sup>	— <sup>c</sup>	— <sup>c</sup>	— <sup>c</sup>	108.9	0.8	111 min
<b>1</b>	Trypsin <sup>f</sup>	— <sup>c</sup>	— <sup>c</sup>	— <sup>c</sup>	113.6	0.2	12.8 h
<b>1</b>	Porcine pancreatic elastase <sup>f</sup>	— <sup>f</sup>	— <sup>c</sup>	— <sup>c</sup>	114.0	0.2	14.3
<b>2</b> <sup>g</sup>	pH = 10.0	112.9	0.2	8.5 h	113.8	0.2	12 h
<b>2H+</b>	H <sub>2</sub> O + pH = 7.4 <sup>f</sup>	— <sup>c</sup>	— <sup>c</sup>	— <sup>c</sup>	108.5	0.9	101 min
<b>2H+</b> <sup>g</sup>	pH = 6.0	105.9	2.0	33 min	108.3 <sup>f</sup>	1.0	85 min <sup>h</sup>
<b>7</b> <sup>g</sup>		118.0	$5.0 \times 10^{-2}$	2.5 d	121.3	$1.9 \times 10^{-2}$	9.2 d
<b>7H+</b> <sup>g</sup>	pH = 1.9	109.1	0.8	2 h	110.3	0.5	3 h
<b>8</b> <sup>g</sup>	pH = 10.0	119.0	$3.7 \times 10^{-2}$	3.8 d	119.8	$2.9 \times 10^{-2}$	5 d
<b>8H+</b> <sup>g</sup>	pH = 6.0	112.4	0.3	7 h	115.6	0.10	1 d
<b>8H2+</b> <sup>g</sup>	pH = 1	103.8	3.8	15 min	106.5	1.7	41 min
<b>9</b> <sup>g</sup>		110.6	0.5	3.5 h	115.5	0.1	23 h

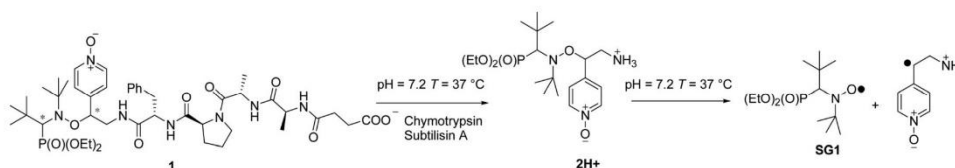
<sup>a</sup> Given in kJ mol<sup>-1</sup>. Estimated using a frequency factor  $A = 2.4 \times 10^{14}$  s<sup>-1</sup>, see the ESI† and ref. 1. <sup>b</sup> Estimated at 37 °C, d for days, h for hours, and min for minutes. <sup>c</sup> Not available. <sup>d</sup> The same values of  $E_a$  are observed for 3 eq. of TFA. <sup>e</sup> Similar values were obtained for 10, 50, and 100 eq. of TFA in the experimental error ( $\pm 1$  kJ mol<sup>-1</sup>). <sup>f</sup> H<sub>2</sub>O, HEPES buffer 50 mM at pH = 7.4, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.15 M NaCl, 0.05% Igepal CA-630, 37 °C. <sup>g</sup> H<sub>2</sub>O/MeOH as solvent. <sup>h</sup> In H<sub>2</sub>O at 37 °C,  $k_d = 1.1 \times 10^{-4}$  s<sup>-1</sup>,  $E_a = 108.8$  kJ mol<sup>-1</sup>,  $t_{1/2} = 105$  min.

To prove the concept described in Introduction, selected alkoxyamines must exhibit the largest possible difference in  $E_a$  between the activated and non-activated form, that is, between an alkoxyamine carrying a de-activating peptide chain and a free alkoxyamine which is protonated at physiological pH, *i.e.*, small  $t_{1/2}$  at 37 °C (Table 1). To highlight our approach, the peptide sequence Suc-Ala-Ala-Pro-Phe- was chosen as it is a well-known substrate for chymotrypsin-like proteases<sup>31</sup> that fits the P<sub>1</sub> side of the catalytic pocket. The *RS/SR* diastereoisomer of **2** was selected as the leaving group (*vide supra*) on the P' side of the enzyme pocket as the de-activate amido homologue is expected to exhibit an  $E_a$  close to 115.5 kJ mol<sup>-1</sup> (**9** as a model with  $t_{1/2} = 23$  hours at 37 °C in water, see Table 1), and as the amino group of **2** is protonated at physiological pH ( $pK_a = 7.97$ ) affording  $E_a = 108.3$  kJ mol<sup>-1</sup> for *RS/SR*-**2H+** ( $t_{1/2} = 85$  minutes at 37 °C in water, see Table 1). Peptide labelled alkoxyamine **1** is obtained as described above as a 1 : 3 mixture of *RSSSSS* and *SRSSSS* diastereoisomers (*SSSS* is the configuration of the enantiomerically pure 4-residue peptide). The C–ON homolysis of **1** affords a first-order decay meaning that the two diastereoisomers are likely to exhibit the same  $k_d$  (Table 1) as the new stereocenters are too far from the reactive centers to exert any influence. Fig. 2 shows the kinetics of **2H+**, **1** and **1** in the presence of various enzymes at 37 °C and pH = 7.4. There is a 5-fold increase in  $k_d$  from peptide-deactivated to activated alkoxyamine (Table 1). Upon addition of chymotrypsin or subtilisin A, values of  $k_d$  very similar to



**Fig. 2** Plot of EPR areas vs. time of the released nitroxide for free **2H+** (black dots), **1** (green dots), and **1** in the presence of chymotrypsin (red dots), subtilisin A (cyan dots), porcine pancreatic elastase (blue dots) and bovine trypsin (magenta dots) at 37 °C in aqueous buffer at pH = 7.4. Solid lines represent the first order fit of the experimental data.

those of **2H+** are observed meaning that the hydrolysis of **1** into **2** by enzyme is fast compared to the homolysis step (Scheme 2 and Fig. 2). However, upon addition of trypsin or porcine pancreatic elastase, both having other substrate preferences than Suc-AAPF-, no activation occurs, that is, their  $k_d$  values are very similar to those of  $k_d$  reported for **1** (Table 1 and Fig. 2) meaning that the enzymatic hydrolysis of the



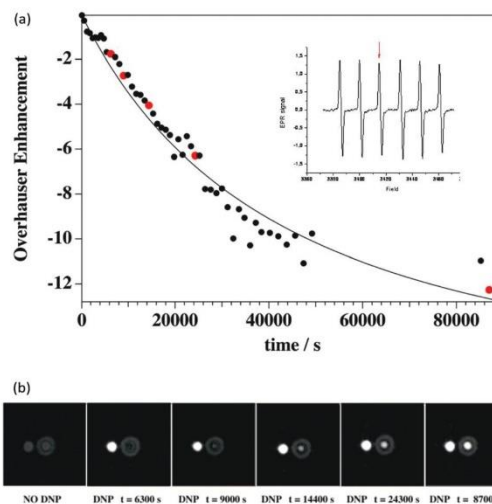
**Scheme 2** Enzymatic hydrolysis of **1** into **2**, protonated as **2H+** both by chymotrypsin and subtilisin A at pH = 7.2, and its subsequent spontaneous homolysis in alkyl radical and nitroxide SG1.

peptide is much slower than its homolysis. Thus, **1** is an activatable alkoxyamine specifically triggered by chymotrypsin-like proteases. Other specificities would be obtained by changing the peptide.

#### *In vitro* Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging experiments<sup>32–34</sup>

In the presence of free radicals, the NMR signal can be strongly enhanced through the Overhauser effect,<sup>35,36</sup> *i.e.* magnetization transfer from unpaired electrons to surrounding water protons.

In an MRI experiment, Overhauser enhancement can be generated by saturating one EPR resonance of the unpaired electrons which transfers a part of the energy to the water protons present at a close enough range to be engaged in a dipole-dipole interaction. As a consequence, an increase in the magnitude of the MRI signal occurs in areas where the free radical is present. Theoretical considerations account for the negative sign of the enhancement values.<sup>37,38</sup> In a conventional MRI system, EPR saturation occurs in the GHz range in a dedicated EPR cavity, whereas MRI acquisition is concomitantly carried out in the radiofrequency range. This is the first report of OMRI using the generation of nitroxide *via* the homolysis of alkoxyamine **2H+** triggered by the enzymatic hydrolysis of **1** using subtilisin A as enzyme (Scheme 2). As highlighted in Fig. 1, hydrolysis of **1** catalyzed by chymotrypsin generated alkoxyamine **2H+** which homolyzed at a fourfold higher rate into an OMRI-visible nitroxide (Scheme 2). As shown in Fig. 3a, the magnitude of the MRI signal could be 8-fold enhanced in the presence of 1.2 mM alkoxyamine, inducing bright contrast revealing the presence of chymotrypsin activity. Fig. 3b shows that specific contrast appears only upon nitroxide transition saturation for the control tube and is further conditioned to enzyme activity for the activatable alkoxyamine. For the completion of the homolysis, 1.4 mM proxyl was added to scavenge the alkyl radical. In contrast to the experiment done using EPR at 0.1 mM during which the alkyl radical reacted with the dissolved oxygen, proxyl was necessary for OMRI since the oxygen is not sufficient to react with 1.2 mM nitroxide. Under biological conditions, there is almost infinite possibility for the alkyl radical reaction and thus the homolysis would always go to completion. Thanks to the specificity brought by the peptide moiety, molecular imaging of drug



**Fig. 3** (a) Plot of Overhauser enhancement vs. time (red dots are for images shown in (b)) of a solution of **1** (1.2 mM) mixed with chymotrypsin (8.10–5 M) and 1.4 mM proxyl to scavenge the alkyl radical at 37 °C in aqueous buffer at pH = 7 (inset: the EPR line of SG1 (red arrow) saturated for the Overhauser effect) **4**. (b) Selected images from key times of the reaction are shown. A stable reference containing 2.3 mM SG1 was added as a control for the Overhauser enhancement (left-hand tube in each image). The first image was obtained without electron resonance saturation (conventional MRI) as a reference to calculate enhancement.

deposition subsequent to protease activity is made possible with OMRI.

## Conclusion

In summary, the concept of smart alkoxyamines<sup>13</sup> is well highlighted by combining biological activation using specific enzymatic activity such as proteolysis and chemical activation such as protonation. Thus, the use of alkoxyamines as theranostic agents is sustainable, provided that future molecules will exhibit a larger gap in activation energies between the pro-drug and the drug and an activation energy for the activated alkoxyamine lower than 90 kJ mol<sup>-1</sup>, *i.e.*,  $t_{1/2} < 4$  s at 37 °C, to disregard any issues due to the diffusion of the activated



alkoxyamines far from the targeted zone. This work is currently in progress in our laboratory.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgements

GA, PB, SRAM, and CW are grateful to Aix-Marseille University and the CNRS for support. LB is grateful to the ANR for the Ph.D. grant (SonRadIs ANR-11-JS07-002-01). TMMK thanks Campus France and the Ministry of Research of Gabon for the Ph.D. grant. GA, SRAM, PM, PV, EP, NJ, AR, and ET thank the ANR for financial support (PULMOZYIMAGE ANR-15-CE18-0012-01). GA, PB, SRAM and TY thank Aix-Marseille University for the A\*MIDEX grant (ANR-11-IDEX-0001-02) funded by the Investissements d'Avenir French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR). This work was achieved within the context of the Laboratory of Excellence TRAIL ANR-10-LABX-57.

## Notes and references

- 1 Nitroxide Mediated Polymerization: From Fundamentals to Applications in Materials Sciences, ed. D. Gigmes, RSC Polymer Chemistry Series 19, Royal Society of Chemistry, London, 2016, and references cited therein.
- 2 J. Nicolas, Y. Guillauneuf, C. Lefay, D. Bertin, D. Gigmes and B. Charleux, *Prog. Polym. Sci.*, 2013, **38**, 63–235.
- 3 C. J. Hawker, A. W. Bosman and E. Harth, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 3661–3688.
- 4 A. Studer, *Chem. Soc. Rev.*, 2004, **33**, 267–273.
- 5 L. Tebben and A. Studer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 5034–5068.
- 6 G. Audran, P. Brémond and S. R. A. Marque, *Chem. Commun.*, 2014, **50**(59), 7921–7928.
- 7 B. Ma, B. Kim, J. D. A. Poulsen, S. J. Pastine and J. M. Fréchet, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 1024–2031.
- 8 D. A. Poulsen, B. J. Kim, B. Ma, C. S. Zonte and J. M. J. Fréchet, *Adv. Mater.*, 2010, **22**, 77–82.
- 9 F. Dumur, Y. Guillauneuf, A. Guerlin, G. Wantz, D. Bertin, F. Miomandre, G. Clavier, D. Gigmes and C. Mayer, *Macromol. Chem. Phys.*, 2011, **212**, 1616–1628.
- 10 L. Charles, C. Laure, J.-F. Lutz and R. K. Roy, *Macromolecules*, 2015, **48**, 4319–4328.
- 11 R. K. Roy, A. Meszynska, C. E. Laure, L. Charles, C. Verchin and J.-F. Lutz, *Nat. Commun.*, 2015, **6**, 1–8.
- 12 R. K. Roy, C. X. Laure, D. Fischer-Krauser, L. Charles and J.-F. Lutz, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 15677–15680.
- 13 G. Audran, P. Brémond, J.-M. Franconi, S. R. A. Marque, P. Massot, P. Mellet, E. Parzy and E. Thiaudière, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 719–723.
- 14 N. A. Popova, G. M. Sysoeva, V. P. Nicolin, V. I. Kaledin, EV. Tretyakov, M. V. Edeleva, S. M. Balakhnin, E. L. Louschnikova, G. Audran and S. Marque, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2017, **164**(1), 49–53.
- 15 T. Steinmetzer, A. Schweinitz, A. Stürzebecher, D. Dönnecke, K. Uhland, O. Schuster, P. Steinmetzer, F. Müller, R. Friedrich, M. E. Than, W. Bode and J. Stürzebecher, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 4116–4126.
- 16 P. Mellet, P. Massot, G. Madelin, S. R. A. Marque, E. Harte, J.-M. Franconi and E. Thiaudière, *PLoS One*, 2009, **4**(4), e5244.
- 17 N. Koonjoo, E. Parzy, P. Massot, M. Lepetit-Coiffé, S. R. A. Marque, J.-M. Franconi, E. Thiaudière and P. Mellet, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2014, **9**(5), 363–371.
- 18 T. Steinmetzer, A. Schweinitz, A. Stürzebecher, D. Dönnecke, K. Uhland, O. Schuster, P. Steinmetzer, F. Müller, R. Friedrich, M. E. Than, W. Bode and J. Stürzebecher, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 4116–4126.
- 19 S. G. Pyne, *Tetrahedron Lett.*, 1987, **28**, 4737–4740.
- 20 D. Albanese, F. Corcella, D. Landin, A. Maia and M. Penso, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1997, 247–250.
- 21 E. Bagryanskaya, P. Brémond, M. Edeleva, S. R. A. Marque, D. Parkhomenko, V. Roubaud and D. Siri, *Macromol. Rapid Commun.*, 2012, **33**(2), 152–157.
- 22 G. Audran, L. Bosco, P. Brémond, S. R. A. Marque, V. Roubaud and D. Siri, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 9914–9920.
- 23 M. V. Edeleva, I. A. Kirilyuk, I. F. Zhurko, D. A. Parkhomenko, Y. P. Tsentlovich and E. G. Bagryanskaya, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 5558–5573.
- 24 G. Audran, R. Bikanga, P. Brémond, M. Edeleva, S. R. A. Marque, P. Nkolo and V. Roubaud, *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 8425–8439.
- 25 G. Audran, P. Brémond, S. R. A. Marque and T. Yamasaki, *J. Org. Chem.*, 2016, **81**, 1981–1988.
- 26 P. Brémond, T. Butscher, V. Roubaud, D. Siri and S. Viel, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 10524–10529.
- 27 P. Brémond, A. Koïta, S. R. A. Marque, V. Pesce, V. Roubaud and D. Siri, *Org. Lett.*, 2012, **14**(1), 358–361.
- 28 G. Audran, P. Brémond, S. R. A. Marque and G. Obame, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 7754–7757.
- 29 G. Audran, P. Brémond, S. R. A. Marque and G. Obame, *Polym. Chem.*, 2012, **3**, 2901–2908.
- 30 G. Audran, P. Brémond, S. R. A. Marque and G. Obame, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**(21), 9634–9640.
- 31 E. G. DelMar, C. Largman, J. W. Brodrick and M. C. Geokas, *Anal. Biochem.*, 1979, **99**(2), 316–320.
- 32 G. Audran, L. Bosco, P. Brémond, J.-M. Franconi, N. Koonjoo, S. R. A. Marque, P. Massot, P. Mellet, E. Parzy and E. Thiaudière, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**(45), 13379–13384.
- 33 N. Jugniot, I. Duttgupta, A. Rivot, P. Massot, C. Cardiet, A. Pissocarro, M. Jean, N. Vanthuyne, J.-M. Franconi, P. Voisin, G. Devouassoux, E. Parzy, E. Thiaudière, S. R. A. Marque, G. Audran, A. Bentaher and P. Mellet, *Free Radicals Biol. Med.*, 2018, **126**, 101–112.

[View Article Online](#)

Research Article

Organic Chemistry Frontiers

- 34 I. Duttagupta, N. Jugniot, G. Audran, J.-M. Franconi, S. R. A. Marque, P. Massot, P. Mellet, E. Parzy, E. Thiaudière and N. Vanthuyne, *Chem. – Eur. J.*, 2018, **24**, 7615–7619.
- 35 A. W. Overhauser, *Phys. Rev.*, 1953, **92**, 411–415.
- 36 T. R. Carver and C. P. Slichter, *Phys. Rev.*, 1953, **92**, 212–213.
- 37 A. Abragam, *Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford University Press, Oxford, 1961.
- 38 K. H. Hausser and D. Stehlik, *Adv. Magn. Reson.*, 1968, **3**, 79–139.

## 7. Bibliographie

Abragam, A. (1955). Overhauser Effect in Nonmetals. *Phys. Rev.* *98*, 1729–1735.

Abragam, A. (1961). *The principles of nuclear magnetism.* (Oxford: Clarendon Press).

Agnihotri, S.P., Singhal, T., Stern, B.J., and Cho, T.A. (2014). Neurosarcoidosis. *Semin. Neurol.* *34*, 386–394.

Akazawa, K., Sugihara, F., Minoshima, M., Mizukami, S., and Kikuchi, K. (2018a). Sensing caspase-1 activity using activatable <sup>19</sup>F MRI nanoprobes with improved turn-on kinetics. *Chem. Commun.* *54*, 11785–11788.

Akazawa, K., Sugihara, F., Nakamura, T., Mizukami, S., and Kikuchi, K. (2018b). Highly Sensitive Detection of Caspase-3/7 Activity in Living Mice Using Enzyme-Responsive <sup>19</sup>F MRI Nanoprobes. *Bioconjug. Chem.* *29*, 1720–1728.

Amin, K., Ekberg-Jansson, A., Löfdahl, C.-G., and Venge, P. (2003). Relationship between inflammatory cells and structural changes in the lungs of asymptomatic and never smokers: a biopsy study. *Thorax* *58*, 135–142.

Ardenkjær-Larsen, J.H., Laursen, I., Leunbach, I., Ehnholm, G., Wistrand, L.-G., Petersson, J.S., and Golman, K. (1998). EPR and DNP Properties of Certain Novel Single Electron Contrast Agents Intended for Oximetric Imaging. *J. Magn. Reson.* *133*, 1–12.

Ardenkjær-Larsen, J.H., Golman, K., Gram, A., Lerche, M.H., Servin, R., Thaning, M., and Wolber, J. (2003). Increase of signal-to-noise of more than 10,000 times in liquid state NMR. *Discov. Med.* *3*, 37–39.

Ashbaugh, D.G., Bigelow, D.B., Petty, T.L., and Levine, B.E. (1967). Acute respiratory distress in adults. *Lancet Lond. Engl.* *2*, 319–323.

Audran, G., Bosco, L., Brémond, P., Franconi, J.-M., Koonjoo, N., Marque, S.R.A., Massot, P., Mellet, P., Parzy, E., and Thiaudière, E. (2015). Enzymatically Shifting Nitroxides for EPR Spectroscopy and Overhauser-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* *54*, 13379–13384.

Ball, L., Vercesi, V., Costantino, F., Chandrapatham, K., and Pelosi, P. (2017). Lung imaging: how to get better look inside the lung. *Ann. Transl. Med.* *5*.

- Barnes, P.J. (2006). Against the Dutch Hypothesis: Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Are Distinct Diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *174*, 240–243.
- Beatty, P.J., Nishimura, D.G., and Pauly, J.M. (2005). Rapid gridding reconstruction with a minimal oversampling ratio. *IEEE Trans. Med. Imaging* *24*, 799–808.
- Bergin, C.J., Pauly, J.M., and Macovski, A. (1991). Lung parenchyma: projection reconstruction MR imaging. *Radiology* *179*, 777–781.
- Bernstein, M., King, K., and Zhu, X. (2004). *Handbook of MRI Pulse Sequences - 1st Edition*.
- Birrer, P., McElvaney, N.G., Rudeberg, A., Sommer, C.W., Liechti-Gallati, S., Kraemer, R., Hubbard, R., and Crystal, R.G. (1994). Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *150*, 207–213.
- Bobko, A.A., Dhimitruka, I., Zweier, J.L., and Khramtsov, V.V. (2007). Trityl Radicals as Persistent Dual Function pH and Oxygen Probes for in Vivo Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy and Imaging: Concept and Experiment. *J. Am. Chem. Soc.* *129*, 7240–7241.
- Bobko, A.A., Eubank, T.D., Voorhees, J.L., Efimova, O.V., Kirilyuk, I.A., Petryakov, S., Trofimov, D.G., Marsh, C.B., Zweier, J.L., Grigor'ev, I.A., et al. (2012). In Vivo Monitoring of pH, Redox Status, and Glutathione Using L-Band EPR for Assessment of Therapeutic Effectiveness in Solid Tumors. *Magn. Reson. Med.* *67*, 1827–1836.
- Bosquillon, C. (2010). Drug transporters in the lung--do they play a role in the biopharmaceutics of inhaled drugs? *J. Pharm. Sci.* *99*, 2240–2255.
- Bourke, S.J. (2006). Interstitial lung disease: progress and problems. *Postgrad. Med. J.* *82*, 494–499.
- Bowers, C.R., and Weitekamp, D.P. (1986). Transformation of Symmetrization Order to Nuclear-Spin Magnetization by Chemical Reaction and Nuclear Magnetic Resonance. *Phys. Rev. Lett.* *57*, 2645–2648.
- Bühling, F., Waldburg, N., Reisenauer, A., Heimburg, A., Golpon, H., and Welte, T. (2004). Lysosomal cysteine proteases in the lung: role in protein processing and immunoregulation. *Eur. Respir. J.* *23*, 620–628.
- Campos, M.A., and Diaz, A.A. (2018). The Role of Computed Tomography for the Evaluation of Lung Disease in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Chest* *153*, 1240–1248.

- Cavallari, E., Carrera, C., Sorge, M., Bonne, G., Muchir, A., Aime, S., and Reineri, F. (2018). The  $^{13}\text{C}$  hyperpolarized pyruvate generated by ParaHydrogen detects the response of the heart to altered metabolism in real time. *Sci. Rep.* *8*, 1–9.
- Chwieralski, C.E., Welte, T., and Bühling, F. (2006). Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis* *11*, 143–149.
- Cichy, J., Potempa, J., and Travis, J. (1997). Biosynthesis of  $\alpha$ 1-Proteinase Inhibitor by Human Lung-derived Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 8250–8255.
- Colegrove, F.D., Schearer, L.D., and Walters, G.K. (1963). Polarization of  $\text{He}^3$  Gas by Optical Pumping. *Phys. Rev.* *132*, 2561–2572.
- Crisford, H., Sapey, E., and Stockley, R.A. (2018). Proteinase 3; a potential target in chronic obstructive pulmonary disease and other chronic inflammatory diseases. *Respir. Res.* *19*, 180.
- C. Slack, C., A. Finbloom, J., Jeong, K., J. Bruns, C., E. Wemmer, D., Pines, A., and B. Francis, M. (2017). Rotaxane probes for protease detection by  $^{129}\text{Xe}$  hyperCEST NMR. *Chem. Commun.* *53*, 1076–1079.
- D’Armiento, J., Dalal, S.S., Okada, Y., Berg, R.A., and Chada, K. (1992). Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell* *71*, 955–961.
- Davis, S.D., Fordham, L.A., Brody, A.S., Noah, T.L., Retsch-Bogart, G.Z., Qaqish, B.F., Yankaskas, B.C., Johnson, R.C., and Leigh, M.W. (2007). Computed Tomography Reflects Lower Airway Inflammation and Tracks Changes in Early Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *175*, 943–950.
- Dey, T., Kalita, J., Weldon, S., Taggart, C., Dey, T., Kalita, J., Weldon, S., and Taggart, C.C. (2018). Proteases and Their Inhibitors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Clin. Med.* *7*, 244.
- Dhimitruka, I., Bobko, A.A., Eubank, T.D., Komarov, D.A., and Khramtsov, V.V. (2013). Phosphonated trityl probes for concurrent in vivo tissue oxygen and pH monitoring using electron paramagnetic resonance-based techniques. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 5904–5910.
- Dimastromatteo, J., Charles, E.J., and Laubach, V.E. (2018). Molecular imaging of pulmonary diseases. *Respir. Res.* *19*, 17.
- van der Doef, H.P.J., Kokke, F.T.M., van der Ent, C.K., and Houwen, R.H.J. (2011). Intestinal Obstruction Syndromes in Cystic Fibrosis: Meconium Ileus, Distal Intestinal Obstruction Syndrome, and Constipation. *Curr. Gastroenterol. Rep.* *13*, 265–270.

Donepudi, M., and Grütter, M.G. (2002). Structure and zymogen activation of caspases. *Biophys. Chem.* *101–102*, 145–153.

Efimova, O.V., Sun, Z., Petryakov, S., Kesselring, E., Caia, G.L., Johnson, D., Zweier, J.L., Khramtsov, V.V., and Samouilov, A. (2011). Variable radio frequency proton–electron double-resonance imaging: Application to pH mapping of aqueous samples. *J. Magn. Reson.* *209*, 227–232.

Ennaifer, R., Ayadi, S., Romdhane, H., Cheikh, M., Nejma, H.B., Bougassas, W., and Hadj, N.B. (2016). Hepatic sarcoidosis: a case series. *Pan Afr. Med. J.* *24*, 209.

European Lung Foundation Les maladies interstitielles pulmonaires.

Faas, H.M., Krupa, J.L., Taylor, A.J., Zamberlan, F., Philp, C.J., Williams, H.E.L., Johnson, S.R., Pavlovskaya, G.E., Thomas, N.R., and Meersmann, T. (2019). Accelerated 19F-MRI Detection of Matrix Metalloproteinase-2/-9 through Responsive Deactivation of Paramagnetic Relaxation Enhancement.

Fahy, J.V., and Dickey, B.F. (2010). Airway Mucus Function and Dysfunction. *N. Engl. J. Med.* *363*, 2233–2247.

Foster, M.A., Grigor'ev, I.A., Lurie, D.J., Khramtsov, V.V., McCallum, S., Panagiotelis, I., Hutchison, J.M.S., Koptioug, A., and Nicholson, I. (2003). In vivo detection of a pH-sensitive nitroxide in the rat stomach by low-field ESR-based techniques. *Magn. Reson. Med.* *49*, 558–567.

Gadek, J.E., Fells, G.A., and Crystal, R.G. (1979). Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science* *206*, 1315–1316.

Gaggar, A., Li, Y., Weathington, N., Winkler, M., Kong, M., Jackson, P., Blalock, J.E., and Clancy, J.P. (2007). Matrix metalloproteinase-9 dysregulation in lower airway secretions of cystic fibrosis patients. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *293*, L96–L104.

Gallo, J., Kamaly, N., Lavdas, I., Stevens, E., Nguyen, Q.-D., Wylezinska-Arridge, M., Aboagye, E.O., and Long, N.J. (2014). CXCR4-Targeted and MMP-Responsive Iron Oxide Nanoparticles for Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *53*, 9550–9554.

Gibson-Corley, K.N., Meyerholz, D.K., and Engelhardt, J.F. (2016). Pancreatic Pathophysiology in Cystic Fibrosis. *J. Pathol.* *238*, 311–320.

Gidaris, D., Kanakoudi - Tsakalidou, F., Papakosta, D., Tzimouli, V., Taparkou, A., Ventouri, M., and Tsanakas, I. (2010). Bronchoalveolar lavage in children with inflammatory and non inflammatory lung disease. *Hippokratia* *14*, 109–114.



- Girod, S., Zahm, J.M., Plotkowski, C., Beck, G., and Puchelle, E. (1992). Role of the physiochemical properties of mucus in the protection of the respiratory epithelium. *Eur. Respir. J.* 5, 477–487.
- Glover, G.H., and Pauly, J.M. (1992). Projection Reconstruction Techniques for Reduction of Motion Effects in MRI. *Magn. Reson. Med.* 28, 275–289.
- Golestani, R., Razavian, M., Ye, Y., Zhang, J., Jung, J.-J., Toczek, J., Gona, K., Kim, H.-Y., Elias, J.A., Lee, C.G., et al. (2017). Matrix Metalloproteinase–Targeted Imaging of Lung Inflammation and Remodeling. *J. Nucl. Med.* 58, 138–143.
- Golman, K., Petersson, J.S., Ardenkjaer-Larsen, J.H., Leunbach, I., Wistrand, L.G., Ehnholm, G., and Liu, K. (2000). Dynamic in vivo oxymetry using overhauser enhanced MR imaging. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* 12, 929–938.
- Gooptu, B., Ekeowa, U.I., and Lomas, D.A. (2009). Mechanisms of emphysema in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights. *Eur. Respir. J.* 34, 475–488.
- Guiberteau, T. (1994). Polarisation dynamique en champ magnetique faible : application a la spectroscopie et a l'oxymetrie. thesis. Strasbourg 1.
- Guo, J., Cao, X., Cleveland, Z.I., and Woods, J.C. (2018). Murine pulmonary imaging at 7T: T2\* and T1 with anisotropic UTE. *Magn. Reson. Med.* 79, 2254–2264.
- Halaweish, A.F., Moon, R.E., Foster, W.M., Soher, B.J., McAdams, H.P., MacFall, J.R., Ainslie, M.D., MacIntyre, N.R., and Charles, H.C. (2013). Perfluoropropane gas as a magnetic resonance lung imaging contrast agent in humans. *Chest* 144, 1300–1310.
- Hane, F.T., Li, T., Smylie, P., Pellizzari, R.M., Plata, J.A., DeBoef, B., and Albert, M.S. (2017). In vivo detection of cucurbit[6]uril, a hyperpolarized xenon contrast agent for a xenon magnetic resonance imaging biosensor. *Sci. Rep.* 7, 41027.
- Hatton, A., Nguyen-Khoa, A., Mogenet, A., Chedevergne, F., Edelman, A., and Sermet-Gaudelus, I. (2013). Mucoviscidose : vers une stratégie thérapeutique personnalisée. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie* 16, 333–340.
- Hingorani, D.V., Montano, L.A., Randtke, E.A., Lee, Y.S., Cárdenas-Rodríguez, J., and Pagel, M.D. (2016). A single diamagnetic catalyCEST MRI contrast agent that detects cathepsin B enzyme activity by using a ratio of two CEST signals. *Contrast Media Mol. Imaging* 11, 130–138.
- Irvin, C.G., and Bates, J.H. (2003). Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respir. Res.* 4, 4.

Jackson, P.L., Xu, X., Wilson, L., Weathington, N.M., Clancy, J.P., Blalock, J.E., and Gaggar, A. (2010). Human Neutrophil Elastase-Mediated Cleavage Sites of MMP-9 and TIMP-1: Implications to Cystic Fibrosis Proteolytic Dysfunction. *Mol. Med.* 16, 159–166.

JM. Pauly, J.M. (2013). Gridding & the NUFFT for Non-Cartesian Image Reconstruction (Salt Lake City, USA: Proceeding ISMRM 21).

Jonischkeit, T., and Woelk, K. (2004). Hydrogen Induced Polarization–Nuclear-Spin Hyperpolarization in Catalytic Hydrogenations without the Enrichment of Para- or Orthohydrogen. *Adv. Synth. Catal.* 346, 960–969.

Kähäri, V.-M., and Saarialho-Kere, U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* 6, 199–213.

Kandolin, R., Lehtonen, J., and Kupari, M. (2011). Cardiac sarcoidosis and giant cell myocarditis as causes of atrioventricular block in young and middle-aged adults. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 4, 303–309.

Kang, M.-J., Park, C.M., Lee, C.-H., Goo, J.M., and Lee, H.J. (2010). Dual-Energy CT: Clinical Applications in Various Pulmonary Diseases. *RadioGraphics* 30, 685–698.

Kao, R.C., Wehner, N.G., Skubitz, K.M., Gray, B.H., and Hoidal, J.R. (1988). Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *J. Clin. Invest.* 82, 1963–1973.

Kashefi, A., Kuo, J., and Shelton, D.K. (2011). Molecular Imaging in Pulmonary Diseases. *Am. J. Roentgenol.* 197, 295–307.

Kauczor, H.-U., Ley-Zaporozhan, J., and Ley, S. (2009). Imaging of Pulmonary Pathologies. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 6, 458–463.

Kheradmand, F., Shan, M., Xu, C., and Corry, D.B. (2012). Autoimmunity in chronic obstructive pulmonary disease: clinical and experimental evidence. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 8, 285–292.

Khramtsov, V. (2005). Biological Imaging and Spectroscopy of pH. *Curr. Org. Chem.* 9, 909–923.

Khramtsov, V.V., Caia, G.L., Shet, K., Kesselring, E., Petryakov, S., Zweier, J.L., and Samouilov, A. (2010). VARIABLE FIELD PROTON-ELECTRON DOUBLE-RESONANCE IMAGING: APPLICATION TO pH-MAPPING OF AQUEOUS SAMPLES. *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* 202, 267.

- King, T.E. (2005). Clinical Advances in the Diagnosis and Therapy of the Interstitial Lung Diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *172*, 268–279.
- Kircher, M.F., Weissleder, R., and Josephson, L. (2004). A Dual Fluorochrome Probe for Imaging Proteases. *Bioconjug. Chem.* *15*, 242–248.
- Kleiner, D.E., and Stetler-Stevenson, W.G. (1999). Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *43*, S42–S51.
- Knowles, M.R., and Boucher, R.C. (2002). Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* *109*, 571–577.
- Kong, X., Sheng, H.X., Lu, G.M., Meinel, F.G., Dyer, K.T., Schoepf, U.J., and Zhang, L.J. (2014). Xenon-Enhanced Dual-Energy CT Lung Ventilation Imaging: Techniques and Clinical Applications. *Am. J. Roentgenol.* *202*, 309–317.
- Koonjoo, N., Parzy, E., Massot, P., Lepetit-Coiffé, M., Marque, S.R.A., Franconi, J.-M., Thiaudiere, E., and Mellet, P. (2014). In vivo Overhauser-enhanced MRI of proteolytic activity. *Contrast Media Mol. Imaging* *9*, 363–371.
- Korkmaz, B., Horwitz, M.S., Jenne, D.E., and Gauthier, F. (2010). Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases. *Pharmacol. Rev.* *62*, 726–759.
- Kossodo, S., Zhang, J., Groves, K., Cuneo, G.J., Handy, E., Morin, J., Delaney, J., Yared, W., Rajopadhye, M., and Peterson, J.D. (2011). Noninvasive In Vivo Quantification of Neutrophil Elastase Activity in Acute Experimental Mouse Lung Injury. *Int. J. Mol. Imaging* *2011*.
- Lacy, P. (2006). Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy Asthma Clin. Immunol. Off. J. Can. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *2*, 98–108.
- Lahousse, L., Seys, L.J.M., Joos, G.F., Franco, O.H., Stricker, B.H., and Brusselle, G.G. (2017). Epidemiology and impact of chronic bronchitis in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* *50*.
- Lai, C.-M., and Lauterbur, P.C. (1981). True three-dimensional image reconstruction by nuclear magnetic resonance zeugmatography. *Phys. Med. Biol.* *26*, 851.
- Lauterbur, P.C. (1973). Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature* *242*, 190–191.

Law, B., and Tung, C.-H. (2009). Proteolysis: a biological process adapted in drug delivery, therapy, and imaging. *Bioconjug. Chem.* *20*, 1683–1695.

Li, H., He, G., Deng, Y., Kuppusamy, P., and Zweier, J.L. (2006). In vivo proton electron double resonance imaging of the distribution and clearance of nitroxide radicals in mice. *Magn. Reson. Med.* *55*, 669–675.

Lillehoj, E.P., and Kim, K.C. (2002). Airway mucus: its components and function. *Arch. Pharm. Res.* *25*, 770–780.

Lingwood, M.D., Ivanov, I.A., Cote, A.R., and Han, S. (2010). Heisenberg spin exchange effects of nitroxide radicals on Overhauser dynamic nuclear polarization in the low field limit at 1.5mT. *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* *204*, 56–63.

Liu, Z., Zhou, X., Shapiro, S.D., Shipley, J.M., Twining, S.S., Diaz, L.A., Senior, R.M., and Werb, Z. (2000). The Serpin  $\alpha$ 1-Proteinase Inhibitor Is a Critical Substrate for Gelatinase B/MMP-9 In Vivo. *Cell* *102*, 647–655.

Loison, F., Zhu, H., Karatepe, K., Kasorn, A., Liu, P., Ye, K., Zhou, J., Cao, S., Gong, H., Jenne, D.E., et al. (2014). Proteinase 3–dependent caspase-3 cleavage modulates neutrophil death and inflammation. *J. Clin. Invest.* *124*, 4445–4458.

Lundgren, J.D., Rieves, R.D., Mullol, J., Logun, C., and Shelhamer, J.H. (1994). The effect of neutrophil proteinase enzymes on the release of mucus from feline and human airway cultures. *Respir. Med.* *88*, 511–518.

Lurie, D.J., Hutchison, J.M.S., Bell, L.H., Nicholson, I., Bussell, D.M., and Mallard, J.R. (1989). Field-cycled proton-electron double-resonance imaging of free radicals in large aqueous samples. *J. Magn. Reson.* *1969* *84*, 431–437.

Lynch, J.P., Kazerooni, E.A., and Gay, S.E. (1997). Pulmonary sarcoidosis. *Clin. Chest Med.* *18*, 755–785.

Madelin, G. (2005). Développements méthodologiques de l'IRM à bas champ : élastographie, interaction IRM-Ultrasons et polarisation dynamique nucléaire.

Mañá, J., and Marcoval, J. (2012). Skin manifestations of sarcoidosis. *Presse Medicale Paris Fr.* *1983* *41*, e355-374.

Marchand, V., Levêque, P., Driesschaert, B., Marchand-Brynaert, J., and Gallez, B. (2016). In vivo EPR extracellular pH-metry in tumors using a triphosphonated trityl radical. *Magn. Reson. Med.* *77*.

Massot, P., Parzy, E., Pourtau, L., Mellet, P., Madelin, G., Marque, S., Franconi, J.-M., and Thiaudiere, E. (2012). In vivo high-resolution 3D Overhauser-enhanced MRI in mice at 0.2 T. *Contrast Media Mol. Imaging* 7, 45–50.

Matsumoto, S., Yasui, H., Batra, S., Kinoshita, Y., Bernardo, M., Munasinghe, J.P., Utsumi, H., Choudhuri, R., Devasahayam, N., Subramanian, S., et al. (2009). Simultaneous imaging of tumor oxygenation and microvascular permeability using Overhauser enhanced MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17898–17903.

Matthay, M.A., Ware, L.B., and Zimmerman, G.A. (2012). The acute respiratory distress syndrome. *J. Clin. Invest.* 122, 2731–2740.

May, T.B., Shinabarger, D., Maharaj, R., Kato, J., Chu, L., DeVault, J.D., Roychoudhury, S., Zielinski, N.A., Berry, A., and Rothmel, R.K. (1991). Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 191–206.

McCracken, J.L., Veeranki, S.P., Ameredes, B.T., and Calhoun, W.J. (2017). Diagnosis and Management of Asthma in Adults: A Review. *JAMA* 318, 279–290.

McGuire, M.J., Lipsky, P.E., and Thiele, D.L. (1993). Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I. *J. Biol. Chem.* 268, 2458–2467.

Mellet, P., Massot, P., Madelin, G., Marque, S.R.A., Harte, E., Franconi, J.-M., and Thiaudière, E. (2009). New Concepts in Molecular Imaging: Non-Invasive MRI Spotting of Proteolysis Using an Overhauser Effect Switch. *PLOS ONE* 4, e5244.

Meyerholz, D.K., Suarez, C.J., Dintzis, S.M., and Frevert, C.W. (2018). 9 - Respiratory System. In *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)*, P.M. Treuting, S.M. Dintzis, and K.S. Montine, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 147–162.

Miller, J.C., Thrall, J.H., and Commission of Molecular Imaging, American College of Radiology (2004). Clinical molecular imaging. *J. Am. Coll. Radiol. JACR* 1, 4–23.

Mims, J.W. (2015). Asthma: definitions and pathophysiology. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 5, S2–S6.

Natterer, J., and Bargon, J. (1997). Parahydrogen induced polarization. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 31, 293–315.

- Ohno, Y., Hatabu, H., Takenaka, D., Adachi, S., Van Cauteren, M., and Sugimura, K. (2001). Oxygen-Enhanced MR Ventilation Imaging of the Lung. *Am. J. Roentgenol.* *177*, 185–194.
- Olsson, L.E., and Hockings, P.D. (2016). In Vivo Measurements of T2 Relaxation Time of Mouse Lungs during Inspiration and Expiration. *PLOS ONE* *11*, e0166879.
- Olsson, L.E., Lindahl, M., Önnervik, P.-O., Johansson, L.B., Palmér, M., Reimer, M.K., Hultin, L., and Hockings, P.D. (2007). Measurement of MR signal and T2\* in lung to characterize a tight skin mouse model of emphysema using single-point imaging. *J. Magn. Reson. Imaging* *25*, 488–494.
- OMS (2019). OMS | La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO).
- O’Sullivan, J.D. (1985). A Fast Sinc Function Gridding Algorithm for Fourier Inversion in Computer Tomography. *IEEE Trans. Med. Imaging* *4*, 200–207.
- Owen, C.A., and Campbell, E.J. (1995). Neutrophil proteinases and matrix degradation. The cellbiology of pericellular proteolysis. *Semin. Cell Biol.* *6*, 367–376.
- Pääkkö, P., Kirby, M., du Bois, R.M., Gillissen, A., Ferrans, V.J., and Crystal, R.G. (1996). Activated neutrophils secrete stored alpha 1-antitrypsin. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *154*, 1829–1833.
- Pandey, K.C., De, S., and Mishra, P.K. (2017). Role of Proteases in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front. Pharmacol.* *8*.
- Park, E.-A., Goo, J.M., Park, S.J., Lee, H.J., Lee, C.H., Park, C.M., Yoo, C.-G., and Kim, J.H. (2010). Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Quantitative and Visual Ventilation Pattern Analysis at Xenon Ventilation CT Performed by Using a Dual-Energy Technique. *Radiology* *256*, 985–997.
- Parzy, E., Bouchaud, V., Massot, P., Voisin, P., Koonjoo, N., Moncelet, D., Franconi, J.-M., Thiaudière, E., and Mellet, P. (2013). Overhauser-Enhanced MRI of Elastase Activity from In Vitro Human Neutrophil Degranulation. *PLoS ONE* *8*.
- Pasadhika, S., and Rosenbaum, J.T. (2015). Ocular Sarcoidosis. *Clin. Chest Med.* *36*, 669–683.
- Pauwels, R.A., Buist, A.S., Calverley, P.M.A., Jenkins, C.R., and Hurd, S.S. (2001). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *163*, 1256–1276.
- Perlmutter, D.H., Brodsky, J.L., Balistreri, W.F., and Trapnell, B.C. (2007). Molecular pathogenesis of alpha-1-antitrypsin deficiency-associated liver disease: A meeting review. *Hepatology* *45*, 1313–1323.

- Petrache, I., Fijalkowska, I., Medler, T.R., Skirball, J., Cruz, P., Zhen, L., Petrache, H.I., Flotte, T.R., and Tudor, R.M. (2006).  $\alpha$ -1 Antitrypsin Inhibits Caspase-3 Activity, Preventing Lung Endothelial Cell Apoptosis. *Am. J. Pathol.* *169*, 1155–1166.
- Pham, C.T.N. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 541.
- Puente, X.S., Sánchez, L.M., Overall, C.M., and López-Otín, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 544–558.
- Puente, X.S., Sánchez, L.M., Gutiérrez-Fernández, A., Velasco, G., and López-Otín, C. (2005). A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 331–334.
- Ragaller, M., and Richter, T. (2010). Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *J. Emerg. Trauma Shock* *3*, 43–51.
- Raghunand, N., and Gillies, R.J. (2000). pH and drug resistance in tumors. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *3*, 39–47.
- Rao, N.V., Wehner, N.G., Marshall, B.C., Gray, W.R., Gray, B.H., and Hoidal, J.R. (1991). Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. *J. Biol. Chem.* *266*, 9540–9548.
- Ratjen, F., Hartog, C.-M., Paul, K., Wermelt, J., and Braun, J. (2002). Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha. *Thorax* *57*, 930–934.
- Rawlings, N.D. (2013). Protease Families, Evolution and Mechanism of Action. In *Proteases: Structure and Function*, K. Brix, and W. Stöcker, eds. (Vienna: Springer Vienna), pp. 1–36.
- Reichert, S., Gass, R., Brandt, C., and Andrès, E. (2008). L'auscultation pulmonaire à l'ère de la médecine factuelle. *Rev. Mal. Respir.* *25*, 674–682.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.-L., et al. (1989). Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Sci. New Ser.* *245*, 1066–1073.
- Saam, B.T., Yablonskiy, D.A., Kodibagkar, V.D., Leawoods, J.C., Gierada, D.S., Cooper, J.D., Lefrak, S.S., and Conradi, M.S. (2000). MR imaging of diffusion of  $(3)\text{He}$  gas in healthy and diseased lungs. *Magn. Reson. Med.* *44*, 174–179.

Samet, J.M., and Cheng, P.W. (1994). The role of airway mucus in pulmonary toxicology. *Environ. Health Perspect.* *102*, 89–103.

Samouilov, A., Efimova, O.V., Bobko, A.A., Sun, Z., Petryakov, S., Eubank, T.D., Trofimov, D.G., Kirilyuk, I.A., Grigor'ev, I.A., Takahashi, W., et al. (2014). In vivo proton-electron double-resonance imaging of extracellular tumor pH using an advanced nitroxide probe. *Anal. Chem.* *86*, 1045–1052.

Sant'agnese, P. a. D., Darling, R.C., Perera, G.A., and Shea, E. (1953). ABNORMAL ELECTROLYTE COMPOSITION OF SWEAT IN CYSTIC FIBROSIS OF THE PANCREAS: Clinical Significance and Relationship to the Disease. *Pediatrics* *12*, 549–563.

Sarracanie, M., Armstrong, B.D., Stockmann, J., and Rosen, M.S. (2014). High speed 3D overhauser-enhanced MRI using combined b-SSFP and compressed sensing. *Magn. Reson. Med.* *71*, 735–745.

Schwarz, M.I., and King, T.E. (2011). *Interstitial Lung Disease* (Shelton, Conn: People's Medical Pub House-USA).

Senn, O., Russi, E.W., Imboden, M., and Probst-Hensch, N.M. (2005).  $\alpha$ 1-Antitrypsin deficiency and lung disease: risk modification by occupational and environmental inhalants. *Eur. Respir. J.* *26*, 909–917.

Shakirov, S.R., Purtov, P.A., Grishin, Y., and Bagryanskaya, E.G. (2006). Electron spin exchange relaxation of radicals in low magnetic field. *Mol. Phys.* *104*, 1739–1749.

Shamamian, P., Schwartz, J.D., Pocock, B.J.Z., Monea, S., Whiting, D., Marcus, S.G., and Mignatti, P. (2001). Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: A role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J. Cell. Physiol.* *189*, 197–206.

Shen, B., Jeon, J., Palner, M., Ye, D., Shuhendler, A., Chin, F.T., and Rao, J. (2013). Positron Emission Tomography Imaging of Drug-Induced Tumor Apoptosis with a Caspase-Triggered Nano-aggregation Probe. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *52*, 10511–10514.

Sigma-Aldrich Parahydrogen Induced Polarization | Sigma-Aldrich.  
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/stable-isotopes/phip-sabre.html>.

Silverman, E.K., and Sandhaus, R.A. (2009). Alpha1-Antitrypsin Deficiency. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2749–2757.

Sinharay, S., Randtke, E.A., Howison, C.M., Ignatenko, N.A., and Pagel, M.D. (2018). Detection of Enzyme Activity and Inhibition during Studies in Solution, In Vitro and In Vivo with CatalyCEST MRI. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* *20*, 240–248.



Sly, P.D., Brennan, S., Gangell, C., de Klerk, N., Murray, C., Mott, L., Stick, S.M., Robinson, P.J., Robertson, C.F., and Ranganathan, S.C. (2009). Lung Disease at Diagnosis in Infants with Cystic Fibrosis Detected by Newborn Screening. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *180*, 146–152.

Solomon, I. (1955). Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Phys. Rev.* *99*, 559–565.

Soriano, J.B., Abajobir, A.A., Abate, K.H., Abera, S.F., Agrawal, A., Ahmed, M.B., Aichour, A.N., Aichour, I., Aichour, M.T.E., Alam, K., et al. (2017). Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Respir. Med.* *5*, 691–706.

T Abboud, R., and Vimalanathan, S. (2008). Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* *12*, 361–367.

Taggart, C.C., Greene, C.M., Carroll, T.P., O’Neill, S.J., and McElvaney, N.G. (2005). Elastolytic Proteases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *171*, 1070–1076.

Tang, X.X., Ostedgaard, L.S., Hoegger, M.J., Moninger, T.O., Karp, P.H., McMenimen, J.D., Choudhury, B., Varki, A., Stoltz, D.A., and Welsh, M.J. (2016). Acidic pH increases airway surface liquid viscosity in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* *126*, 879–891.

The Berlin Definition (2012). Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. *JAMA* *307*, 2526–2533.

Thumerel, M. (2015). Approche translationnelle du remodelage bronchique dans la broncho-pneumopathie chronique obstructive et l’asthme. phdthesis. Université de Bordeaux.

Togao, O., Tsuji, R., Ohno, Y., Dimitrov, I., and Takahashi, M. (2010). Ultrashort echo time (UTE) MRI of the lung: Assessment of tissue density in the lung parenchyma. *Magn. Reson. Med.* *64*, 1491–1498.

Trotier, A.J., Lefrançois, W., Van Renterghem, K., Franconi, J., Thiaudière, E., and Miraux, S. (2015a). Positive contrast high-resolution 3D-cine imaging of the cardiovascular system in small animals using a UTE sequence and iron nanoparticles at 4.7, 7 and 9.4 T. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* *17*, 53.

Trotier, A.J., Lefrançois, W., Ribot, E.J., Thiaudiere, E., Franconi, J.-M., and Miraux, S. (2015b). Time-resolved TOF MR angiography in mice using a prospective 3D radial double golden angle approach. *Magn. Reson. Med.* *73*, 984–994.

- Trotier, A.J., Castets, C.R., Lefrançois, W., Ribot, E.J., Franconi, J.-M., Thiaudière, E., and Miraux, S. (2016). USPIO-enhanced 3D-cine self-gated cardiac MRI based on a stack-of-stars golden angle short echo time sequence: Application on mice with acute myocardial infarction. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* 44, 355–365.
- Turk, B., and Stoka, V. (2007). Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Lett.* 581, 2761–2767.
- Van Hoecke, L., Job, E.R., Saelens, X., and Roose, K. (2017). Bronchoalveolar Lavage of Murine Lungs to Analyze Inflammatory Cell Infiltration. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Van Vaals, J.J. V., Brummer, M.E., Dixon, W.T., Tuithof, H.H., Engels, H., Nelson, R.C., Gerety, B.M., Chezmar, J.L., and Boer, J.A.D. (1993). “Keyhole” method for accelerating imaging of contrast agent uptake. *J. Magn. Reson. Imaging* 3, 671–675.
- Verma, S., Dixit, R., and Pandey, K.C. (2016). Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Front. Pharmacol.* 7.
- Virgincar, R.S., Cleveland, Z.I., Kaushik, S.S., Freeman, M.S., Nouls, J., Cofer, G.P., Martinez-Jimenez, S., He, M., Kraft, M., Wolber, J., et al. (2013). Quantitative analysis of hyperpolarized <sup>129</sup>Xe ventilation imaging in healthy volunteers and subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *NMR Biomed.* 26, 424–435.
- Voelkel, N.F., Gomez-Arroyo, J., and Mizuno, S. (2011). COPD/emphysema: The vascular story. *Pulm. Circ.* 1, 320–326.
- Voynow, J.A., Young, L.R., Wang, Y., Horger, T., Rose, M.C., and Fischer, B.M. (1999). Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 276, L835-843.
- Voynow, J.A., Fischer, B.M., and Zheng, S. (2008). Proteases and Cystic Fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1238–1245.
- Waddington, D.E.J., Sarracanie, M., Salameh, N., Herisson, F., Ayata, C., and Rosen, M.S. (2018). An Overhauser-enhanced-MRI platform for dynamic free radical imaging in vivo. *NMR Biomed.* 31, e3896.
- Wajer, F., Lethmate, R., Jong, R., Martinez, L., Graveron-Demilly, D.J., Fuderer, M., and Ormondt, D. (2000). MR Image Reconstruction from Sparse and Corrupted k-Space Data.

- Walker, T.G., and Happer, W. (1997). Spin-exchange optical pumping of noble-gas nuclei. *Rev. Mod. Phys.* *69*, 629–642.
- Ware, L.B. (2006). Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* *27*, 337–349.
- Weissleder, R., and Mahmood, U. (2001). Molecular Imaging. *Radiology*.
- Weissleder, R., Tung, C.-H., Mahmood, U., and Jr, A.B. (1999). In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat. Biotechnol.* *17*, 375–378.
- West, J.-B. (1995). *PHYSIOPATHOLOGIE RESPIRATOIRE. : 2ème édition* (Paris: Editions Pradel).
- West, J.B., and Luks, A.-M. (2017). *Physiologie respiratoire : L'essentiel - Pradel - Livres* (Maloine).
- Wiedow, O., Lüdemann, J., and Utecht, B. (1991). Elafin is a potent inhibitor of proteinase 3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *174*, 6–10.
- Wielpütz, M.O., Heußel, C.P., Herth, F.J.F., and Kauczor, H.-U. (2014). Radiological Diagnosis in Lung Disease. *Dtsch. Ärztebl. Int.* *111*, 181–187.
- Wild, J.M., Marshall, H., Bock, M., Schad, L.R., Jakob, P.M., Puderbach, M., Molinari, F., Beek, E.J.R.V., and Biederer, J. (2012). MRI of the lung (1/3): methods. *Insights Imaging* *3*, 345–353.
- Withana, N.P., Ma, X., McGuire, H.M., Verdoes, M., Linden, W.A. van der, Ofori, L.O., Zhang, R., Li, H., Sanman, L.E., Wei, K., et al. (2016). Non-invasive Imaging of Idiopathic Pulmonary Fibrosis Using Cathepsin Protease Probes. *Sci. Rep.* *6*, 19755.
- Witko-Sarsat, V., Halbwachs-Mecarelli, L., Schuster, A., Nusbaum, P., Ueki, I., Canteloup, S., Lenoir, G., Descamps-Latscha, B., and Nadel, J.A. (1999). Proteinase 3, a Potent Secretagogue in Airways, Is Present in Cystic Fibrosis Sputum. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *20*, 729–736.
- Wolters, P.J., and Chapman, H.A. (2000). Importance of lysosomal cysteine proteases in lung disease. *Respir. Res.* *1*, 170–177.
- World Health Organisation World Health Organization Report: Burden of Chronic Respiratory Disease.
- Wright, J.L., and Churg, A. (1995). Smoke-induced emphysema in guinea pigs is associated with morphometric evidence of collagen breakdown and repair. *Am. J. Physiol.* *268*, L17-20.

Xia, Z., Xing, Y., Jeon, J., Kim, Y.-P., Gall, J., Dragulescu-Andrasi, A., Gambhir, S.S., and Rao, J. (2011). Immobilizing reporters for molecular imaging of the extracellular microenvironment in living animals. *ACS Chem. Biol.* **6**, 1117–1126.

Xiao, Y.-D., Paudel, R., Liu, J., Ma, C., Zhang, Z.-S., and Zhou, S.-K. (2016). MRI contrast agents: Classification and application (Review). *Int. J. Mol. Med.* **38**, 1319–1326.

Ye, D., Shuhendler, A.J., Pandit, P., Brewer, K.D., Tee, S.S., Cui, L., Tikhomirov, G., Rutt, B., and Rao, J. (2014). Caspase-responsive smart gadolinium-based contrast agent for magnetic resonance imaging of drug-induced apoptosis. *Chem. Sci. R. Soc. Chem.* **2010 4**, 3845–3852.

Yhee, J.Y., Kim, S.A., Koo, H., Son, S., Ryu, J.H., Youn, I.-C., Choi, K., Kwon, I.C., and Kim, K. (2012). Optical Imaging of Cancer-Related Proteases Using Near-Infrared Fluorescence Matrix Metalloproteinase-Sensitive and Cathepsin B-Sensitive Probes. *Theranostics* **2**, 179–189.

Yoo, B., and Pagel, M.D. (2006). A PARACEST MRI Contrast Agent To Detect Enzyme Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 14032–14033.

Yoo, B., Sheth, V.R., Howison, C.M., Douglas, M.J.K., Pineda, C.T., Maine, E.A., Baker, A.F., and Pagel, M.D. (2014). Detection of in vivo enzyme activity with catalyCEST MRI. *Magn. Reson. Med. Off. J. Soc. Magn. Reson. Med. Soc. Magn. Reson. Med.* **71**, 1221–1230.