



Equipe ICS Imagerie Chimique et Spéciation

Pôle Santé & Environnement, LP2i Bordeaux

Equipe Imagerie Chimique et Spéciation (ICS)

- **Objectifs**

- développer des **approches analytiques pour l'imagerie et la spéciation des éléments chimiques dans le domaine des neurosciences**,
- pour comprendre les **fonctions neurologiques des métaux** et les **effets neurotoxiques d'éléments stables ou radioactifs**.

- **Les techniques analytiques**

- **Imagerie par faisceau d'ions** (PIXE, RBS) sur la plateforme AIFIRA du LP2iB.
- **Imagerie et spéciation par rayonnement synchrotron** (SXRF, XAS) auprès des installations TGIR ESRF (EU), SOLEIL (F), DESY (D), APS (USA).

Historique et composition de l'équipe ICS

- **Historique**

- **2004** : création de l'équipe au CNAB (Laboratoire de Chimie Nucléaire Analytique et Bio-environnementale) (INC)
- **2011** : fusion du CNAB et du CENBG, aujourd'hui LP2iB (tutelle principale IN2P3, secondaire INC).

- **4 permanents**

- **Asuncion Carmona** (CRCN – HDR)
- **Stéphane Roudeau** (IRHC)
- **Bertrand Thomas** (IRHC – mobilité interne: janvier 2023)
- **Richard Ortega** (DR1, HDR)

- **Section 13** : Chimie physique, théorique et analytique

Mots clés: **Développements méthodologiques en chimie analytique et spectroscopies**; Chimie de l'environnement (spéciation).

Construction du bâtiment CREATIF et déménagements

- **Travaux de construction du bâtiment CREATIF (4 ans de retard)**
 - **2018** déménagement à l'**Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (IINS)**, initialement pour 1 an, puis prolongé 1 an.
 - **2020** déménagement au **Bordeaux Imaging Center (BIC)**, toujours sur le Neurocampus, et poursuite de la collaboration avec l'IINS.
 - **2023**. Retour prévu au LP2iB.

Neurocampus



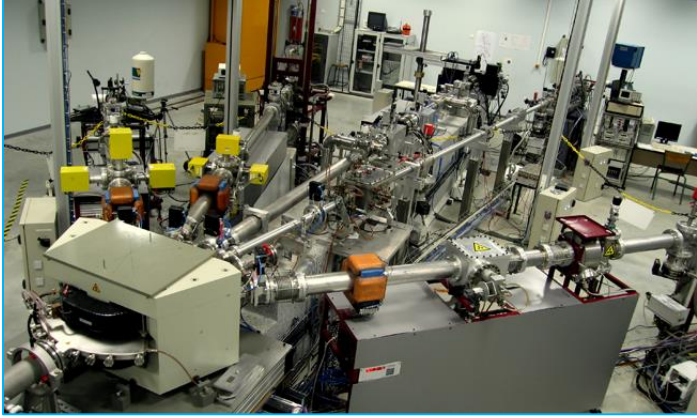
Construction du bâtiment CREATIF

=> impact sur non-permanents

- **Fort impact sur le recrutement de non-permanents:**
 - Incertitude sur l'accès aux laboratoires:
Dernière thèse **Octobre 2019** et dernier postdoc **Mai 2019**.
 - **Février 2023 Karina Khambatta**, Postdoc (2 ans)
Projet ANR SuperResMetalToxSyn.
 - **Février 2023 : Aiyarin Kittilukkana**, Doctorante (10 mois)
Co-direction Université Chiang Mai (Thaïlande)
Sujet: Role of labile iron on brain cell functions and monitoring of iron signals via X-ray fluorescence and magnetic signal change.

Outils: faisceaux d'ions et rayonnement synchrotron

AIFIRA, Gradignan



ESRF, Grenoble



SOLEIL, Paris-Saclay



DESY PETRAIII, Hambourg



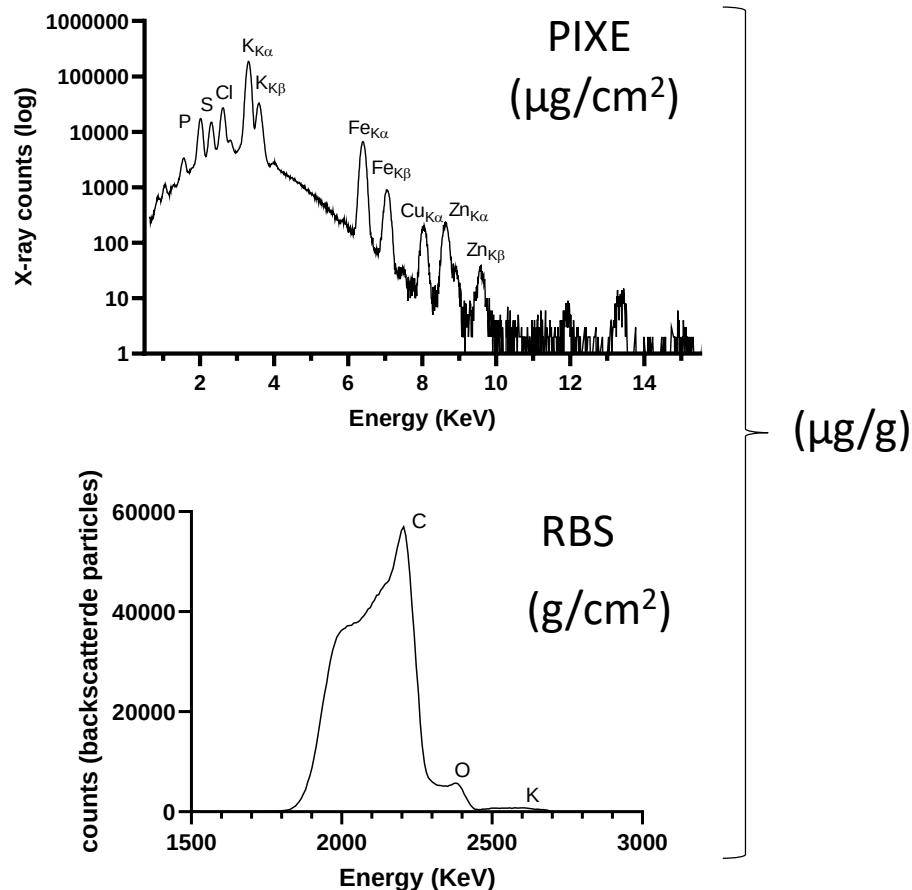
APS, Chicago



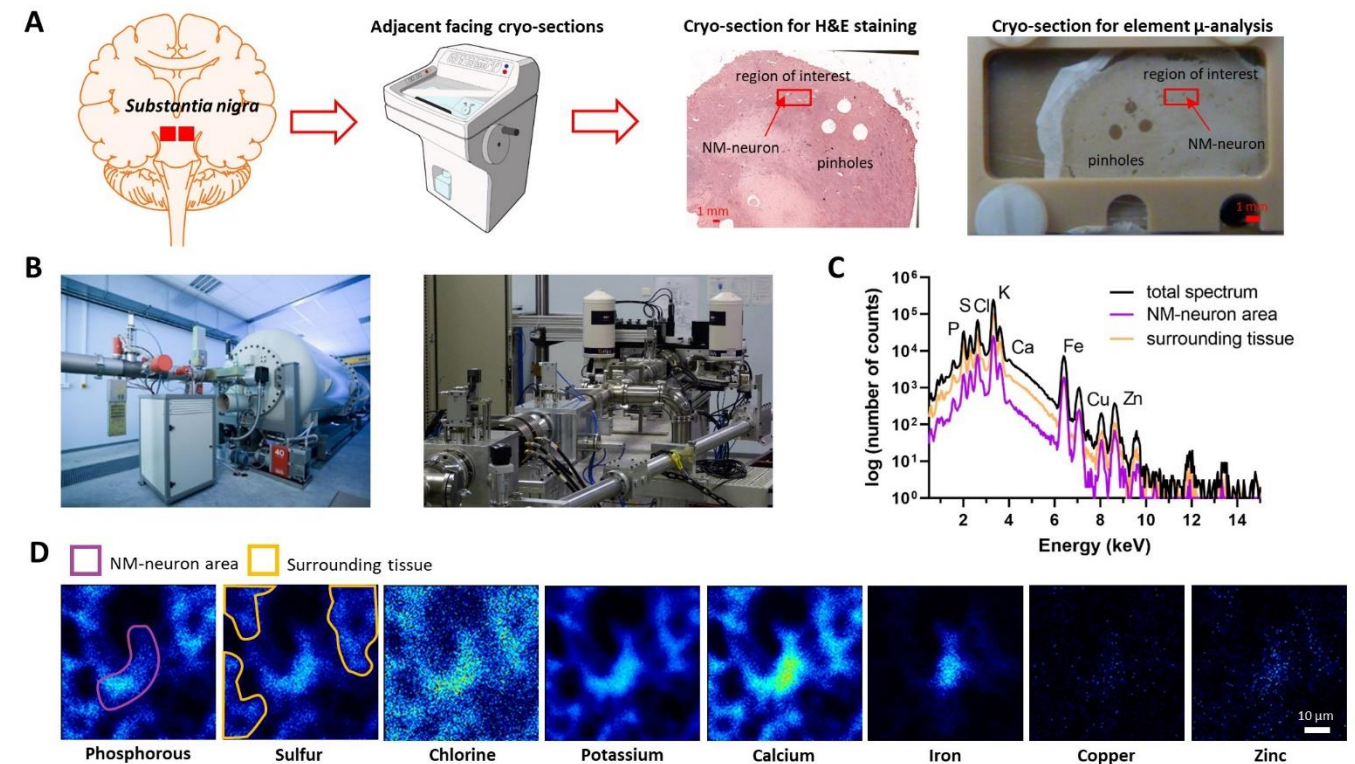
Méthodes analytiques : microfaisceau de protons

Plateforme AIFIRA du LP2iB : PIXE Particle Induced X-ray Emission / RBS Rutherford Backscattering Spectrometry.

- Imagerie quantitative des éléments chimiques**



Imagerie quantitative métaux / histologie sur des coupes de cerveaux

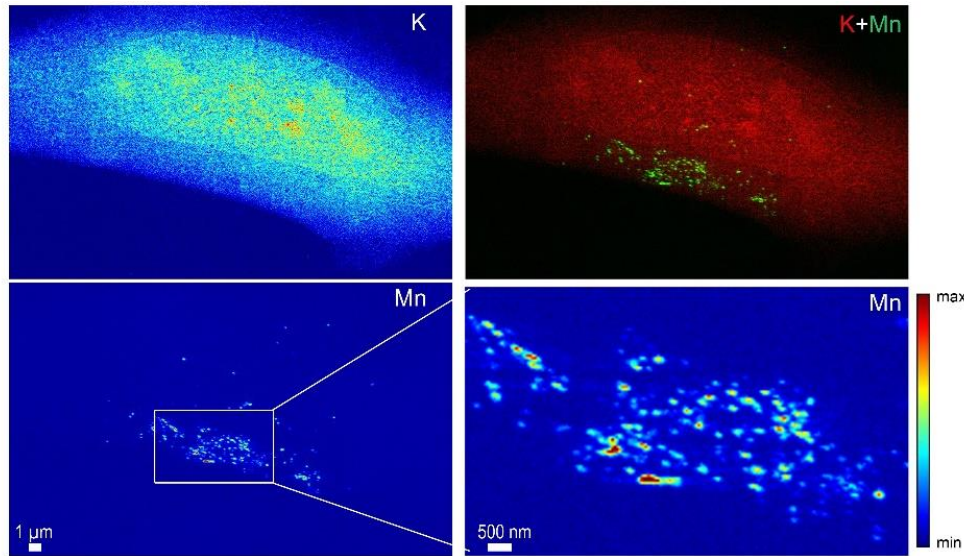


Dyshoméostasie des métaux dans la maladie de Parkinson

Méthodes analytiques : nano-faisceaux synchrotron

Imagerie chimique (fluorescence X : SXRF)

- Nano-localisation des éléments chimiques : compartimentation intracellulaire

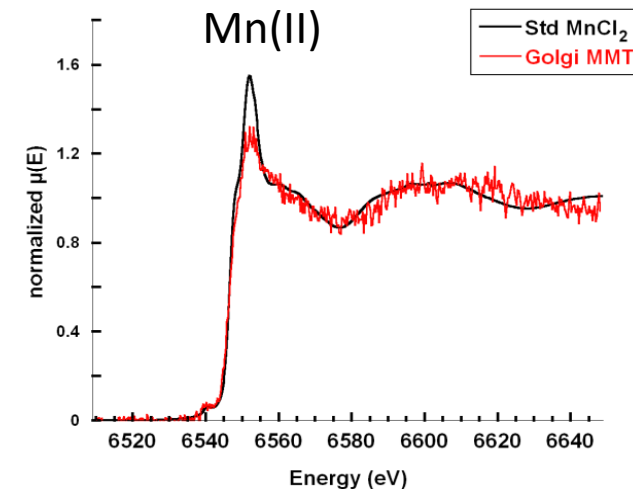


Accumulation du manganèse dans les nano-vésicules de l'appareil de Golgi dans les formes héréditaires de parkinsonisme (Carmona et al., 2019).

Imagerie chimique à l'échelle sub-organelles

Spéciation chimique (absorption X : XAS, XANES)

- Nature des espèces chimiques (ex. redox)



Le manganèse est présent sous forme de Mn(II) dans l'appareil de Golgi une espèce réduite et réactive (Carmona et al., 2014).

Spéciation chimique à l'échelle des organelles cellulaires

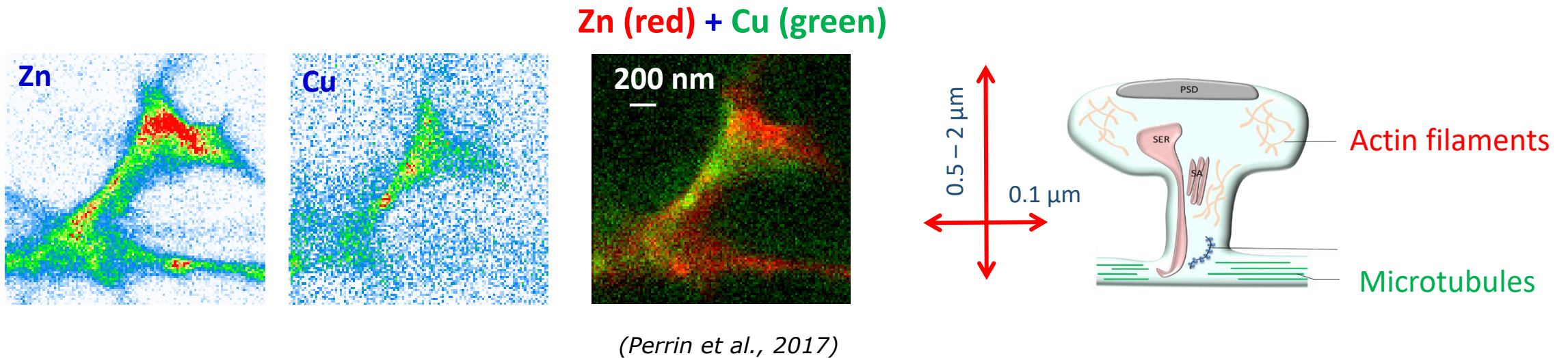
Travaux de recherche ICS (2017-2022)

Faits marquants

Nano-imagerie corrélative (<40 nm) des protéines et des métaux synaptiques

- **Contexte**

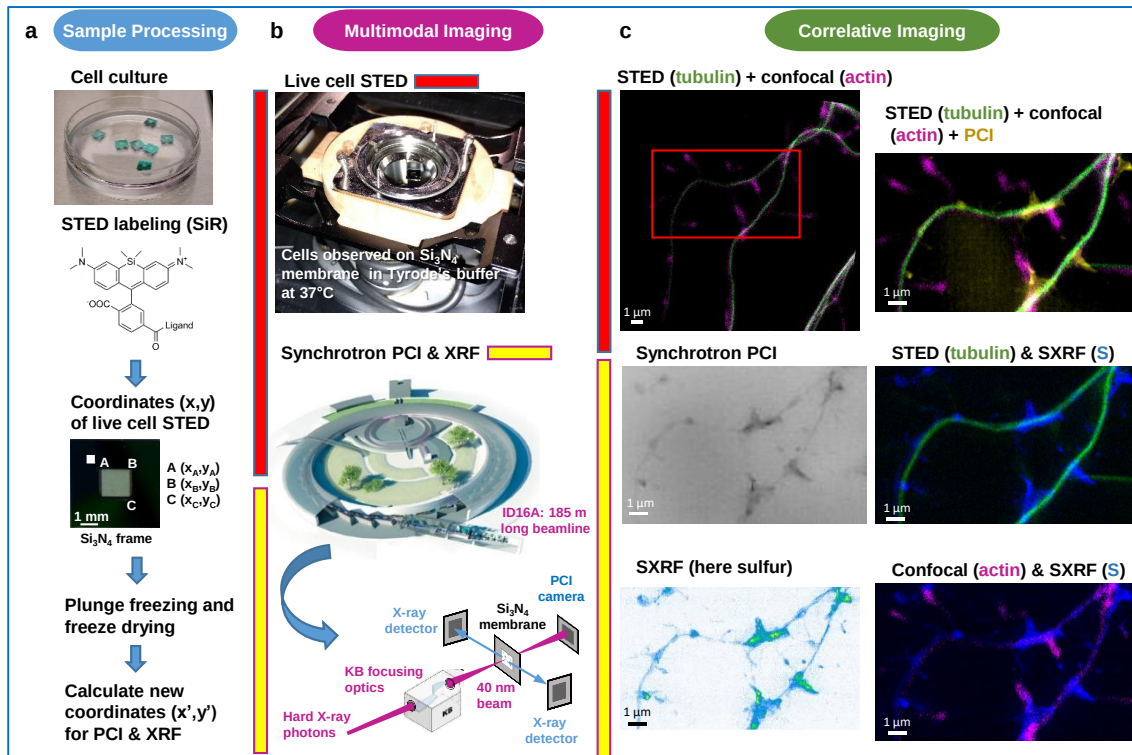
- Premières images de la distribution de métaux et de protéines à l'échelle synaptique (Perrin et al., 2017).
- Etude de l'interaction des métaux endogènes (physiologiques) avec les protéines du cytosquelette formant les synapses (tubuline et actine-F).



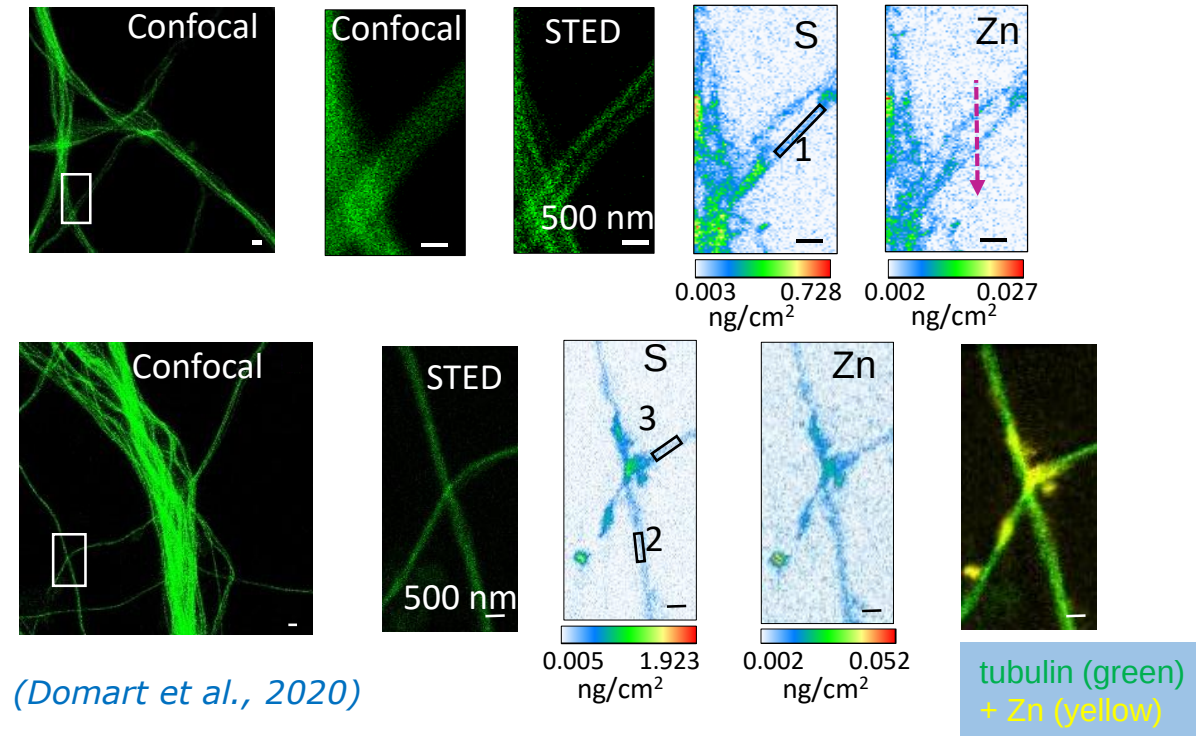
- **Collaboration:** **Daniel Choquet**, équipe 'Dynamique de l'organisation et des fonctions synaptiques', Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (IINS), CNRS, Univ. Bordeaux.

Nano-imagerie corrélative (<40 nm) des protéines et des métaux synaptiques

- Développement d'un protocole de nano-imagerie corrélative STED (stimulated emission depletion) et nano-SXRF



1 atome de Zn par dimère tubuline- $\alpha\beta$



(Domart et al., 2020)

- Collaboration:** Peter Cloetens (The European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble).
Daniel Choquet (Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, CNRS, Univ. Bordeaux).

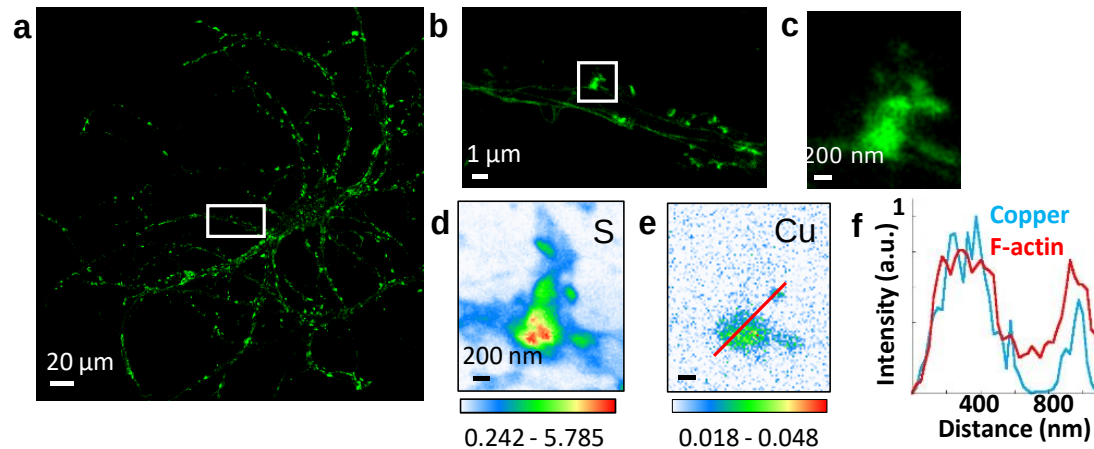
Rôle nouveau du Cu et du Zn dans la plasticité synaptique morphologique

• Résultats

- Le **zinc** participe à la stabilisation des **microtubules** (1 atome Zn / dimère de tubuline).
- Le **cuivre** est co-localisé avec **l'actine-F** dans le compartiment post-synaptique.

Neurone

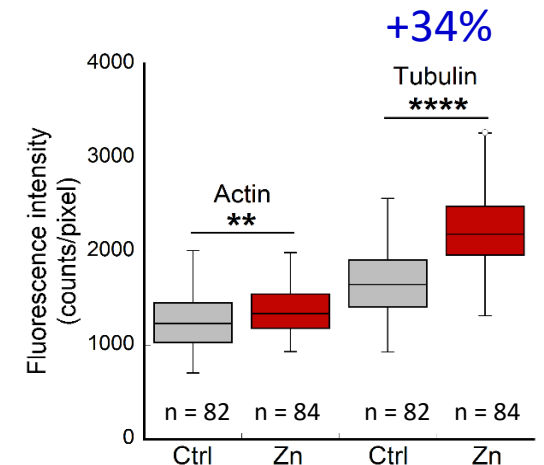
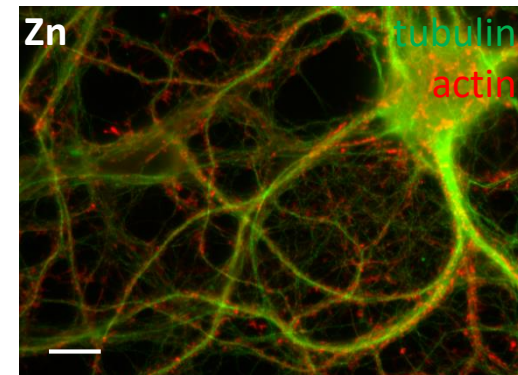
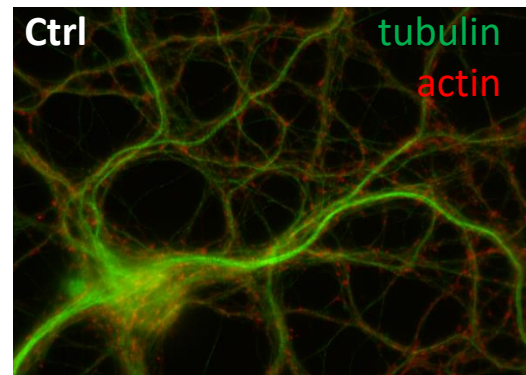
STED actine-F (synapse)



Imagerie STED (protéines) et synchrotron XRF (éléments chimiques) dans les compartiments synaptiques de neurones primaires hippocampiques.

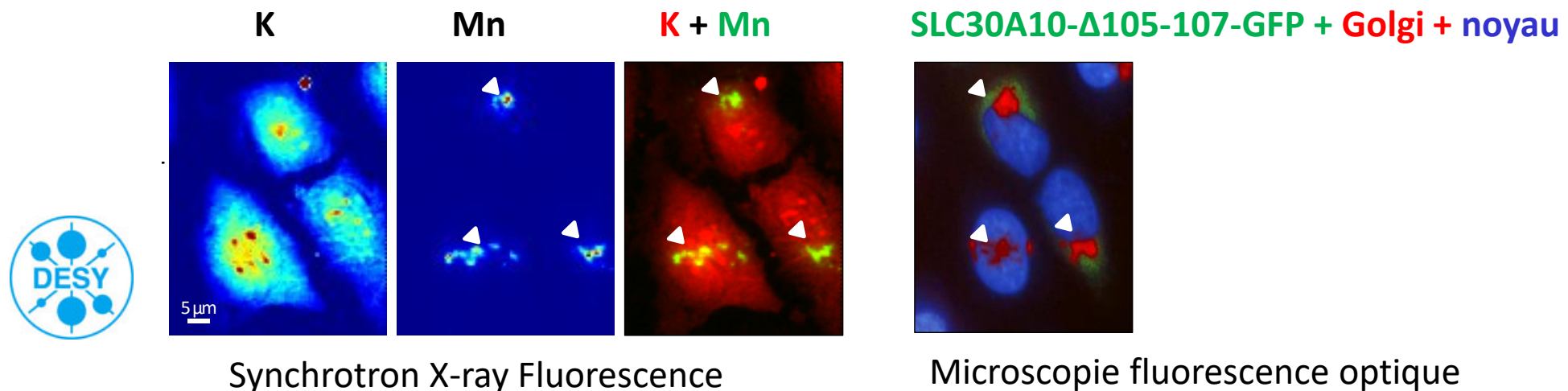
(Domart et al., 2020)

Immunofluorescence quantitative de l'actine et la tubuline après supplémentation en Zn (10 μM).



Neurotoxicologie du manganèse (1)

- **Contexte:** le manganèse est un métal essentiel mais neurotoxique à dose élevée, il provoque des symptômes proches de ceux de la maladie de Parkinson (parkinsonisme).
- **Les cibles intracellulaires de neurotoxicité du Mn n'étaient pas connues.**
- En combinant la microscopie de fluorescence optique des organites cellulaires avec l'imagerie SXRF, nous avons montré **l'accumulation du Mn dans l'appareil de Golgi**, pour différents types cellulaires (Carmona et al., 2010 & 2014; Das et al., 2019), et son implication dans les formes familiales de parkinsonisme (mutation gène *slc30a10*; Carmona et al., 2019).
- **Collaborations :** S. Mukhopadhyay, Univ. Austin Texas (USA), A. Datta, Tata Institute Mumbai (Inde), A. Somogyi, **SOLEIL**, P. Cloetens, **ESRF**, G. Falkenberg, synchrotron **DESY-PETRAIII**, Hambourg.

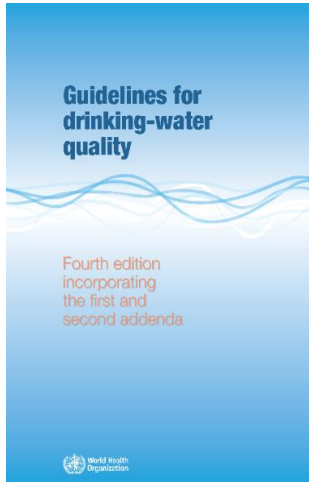


Neurotoxicologie du manganèse (2)

- **Contexte:** les préparations de lait pour nourrisson contiennent-elles trop de Mn ?
- **Analyses PIXE/RBS (AIFIRA) :** les concentrations en Mn dépassent toujours celles du lait humain (x10-x1000), dépassant parfois les seuils de toxicité, surtout si le lait est préparé avec une eau naturellement riche en Mn.
- **L'Organisation Mondiale pour la Santé** propose une nouvelle valeur maximale recommandée pour le manganèse dans l'eau de boisson et passe de '*pas de limite*' (anciennement 400 µg/L de 1958 à 2011) à 80 µg/L, en se basant en partie sur nos travaux !!!
- **Collaboration:** Seth H. Frisbie et Erika Mitchell (Norwich University, VT, USA).

Provisional guideline value

Total manganese: 0.08 mg/l (80 µg/l), to be protective against neurological effects in the most sensitive subpopulation—bottle-fed infants—and consequently the general population



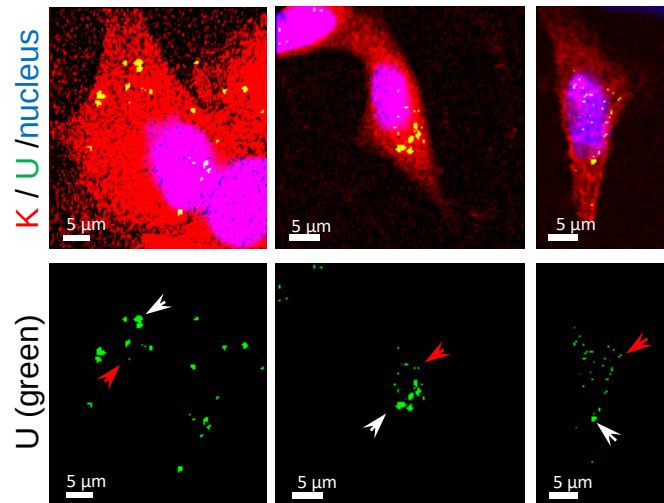
Frisbie SH, Mitchell EJ, Roudeau S, Domart F, Carmona A, Ortega R (2019). Manganese levels in infant formula and young child nutritional beverages in the United States and France: Comparison to breast milk and regulations. 14(11).

Mitchell EJ et al. (2020). Estimating daily intakes of manganese due to breast milk, infant formulas, or young child nutritional beverages in the United States and France: Comparison to sufficiency and toxicity thresholds. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 62, p. 126607.



Neurotoxicologie de l'uranium

- **Contexte:** l'uranium même à faible dose provoque des effets neurotoxiques, notamment sur le système dopaminergique. Les mécanismes de neurotoxicité ne sont pas connus.
- **Résultats ICS:** effets neurotoxiques observés loin du seuil de cytotoxicité : inhibition du catabolisme de la dopamine (Monoamine oxydase B).
- **Analyses PIXE/RBS (AIFIRA) et SXRF (Nanoscopium, SOLEIL):** agrégats cytoplasmiques d'uranium aux doses non cytotoxiques.
- **Collaboration :** C. Vidaud, CEA Marcoule; C. Bresson, CEA Saclay; V. Malard, CEA Cadarache, et A. Somogyi, synchrotron SOLEIL.
- **Financements :** Programme de Toxicologie Nucléaire CEA, PEPS CNRS Faidora, IN2P3



Imagerie synchrotron XRF (résolution 150 nm; synchrotron SOLEIL) de cellules dopaminergiques après exposition continue à 10 μ M d'uranium (Carmona et al., 2020).

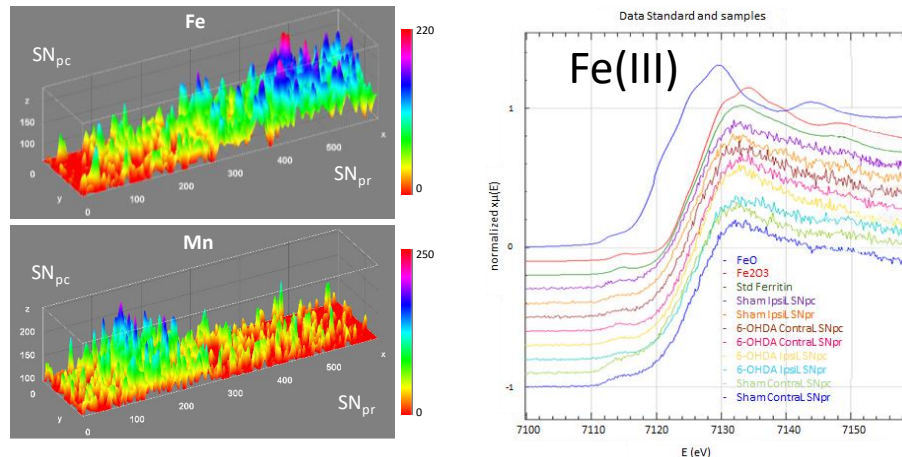
Dyshoméostasie des métaux et maladie de Parkinson

- **Contexte**

- Les causes de la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson sont très mal connues.
- Surexpression (et agrégation) de la α -synucléine ainsi que l'accumulation de fer sont deux caractéristiques moléculaires observées dans les neurones dopaminergiques chez les parkinsoniens.

- **Résultats**

- **Mise en évidence de l'interaction du fer et de l' α -synucléine** (modèles cellulaires Parkinson).
- **Compartimentation du fer et du manganèse** dans les régions cérébrales substantia nigra pars compacta et pars reticulata, pas de **modification de la spéciation du fer** (modèle animal Parkinson).



Imagerie micro-SXRF (SOLEIL) du Fe et du Mn dans la substantia nigra pars compacta (SNpc) et pars reticulata (SNpr), et spéciation micro-XANES du Fe (Carmona et al., 2019).

- **Collaborations:** P. Lingor, Univ. Göttingen; P. Cloetens, synchrotrons ESRF; M. Savasta et Sylvain Bohic, Grenoble Institut Neurosciences; D. Vantelon, SOLEIL.

Dyshoméostasie des métaux: superoxide dismutase, sclérose latérale amyotrophique et Parkinson

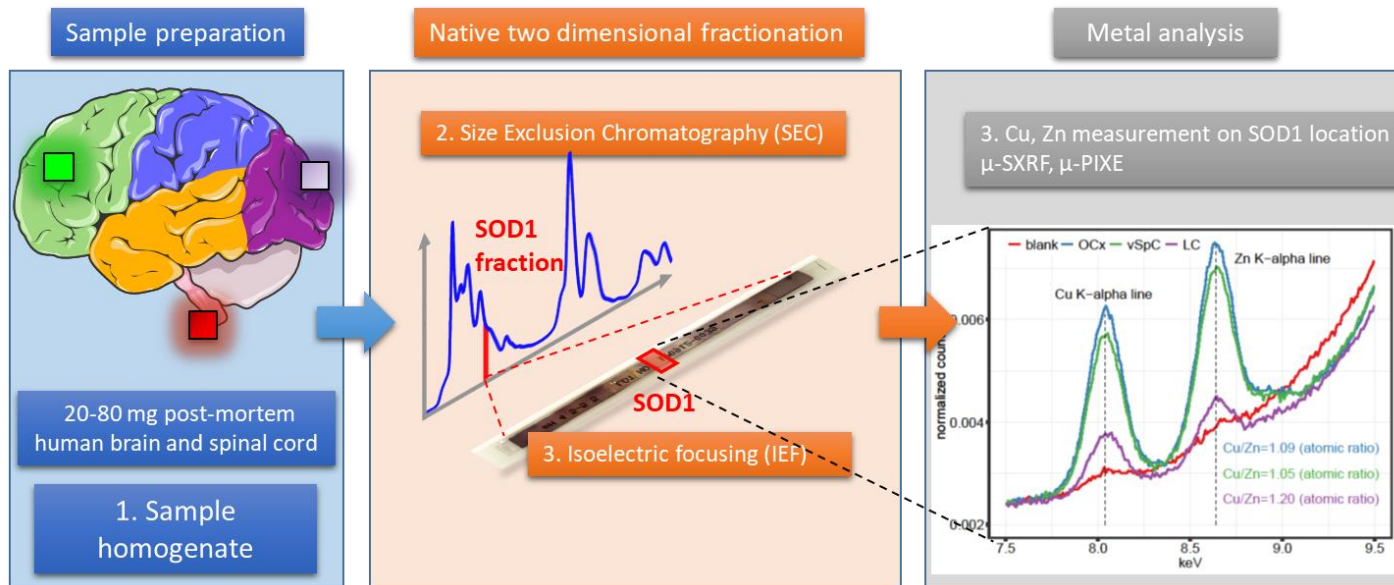
- **Contexte**

- L'agrégation de la superoxide dismutase à Cu,Zn (SOD1) est impliquée dans la dégénérescence des motoneurones de la moelle épinière de certaines formes familiales de sclérose latérale amyotrophique.
- Un défaut de métallation de la SOD1 pourrait contribuer à son agrégation toxique.

- **Développement d'une méthode de séparation de la SOD1 en conditions natives** et d'analyse du Cu / Zn par rayonnement synchrotron ou par faisceaux d'ions (Roudeau et al., 2021).

≈13.000
protéines
système nerveux

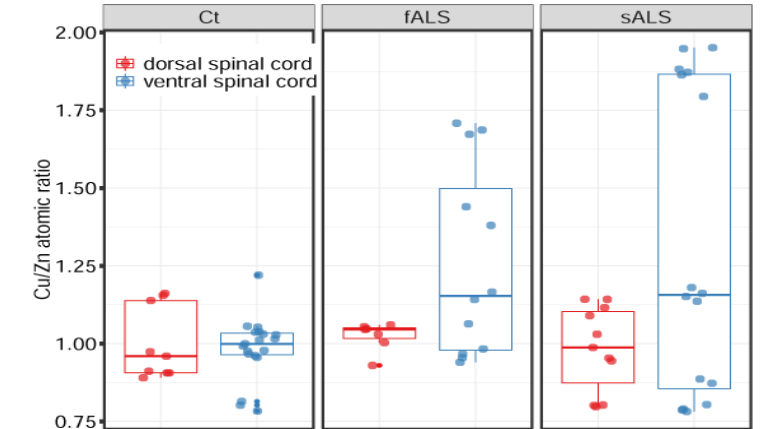
SOD1 ≈9000^{ème}
en abondance



(Roudeau et al., 2021)

Dyshoméostasie des métaux: superoxide dismutase, sclérose latérale amyotrophique et Parkinson

- **Mise en évidence de défauts de métallation de la SOD1** dans les **formes familiales** et **sporadiques** de sclérose latérale amyotrophique (Trist et al., 2022).
- **Découvertes de l'agrégation de la SOD1** dans la substantia nigra des patients parkinsoniens et de la **modification du point isoélectrique de la SOD1** suggérant un défaut de métallation pouvant être à l'origine de cette agrégation (Trist et al., 2017).



- **Collaborations :**
 - **Kay L. Double**, The University of Sydney.
 - Gerald Falkenberg, Synchrotron DESY, Hambourg.
- **Plateformes Université de Bordeaux**
 - Biochimie et Biophysique, Bordeaux Neurocampus.
 - Protéome, Centre Génomique Fonctionnelle Bordeaux.

Production Scientifique

Bilan des publications de l'équipe (2017-2022)

- **27 articles** dans des journaux avec comité de lecture.
- facteurs d'impacts : **3<IF<17**: Acta Neuropathologica (17,09); Brain (13,50); Trends in Analytical Chemistry (9,80); eLife (8,14); Analytical Chemistry (6,99)...
- >50 contributions dans des conférences internationales (13 invitations).
- Coordination d'un ouvrage : Neurotoxicity of Metal Toxicants.

Top 6 /121 revues en Chimie Analytique

All subject areas		Analytical Chemistry	
Title	Type	↓ SJR	H index
1 Current Opinion in Chemical Biology	journal	3.064 Q1	184
2 Annual Review of Analytical Chemistry	journal	3.011 Q1	73
3 Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	journal	2.999 Q1	104
4 Molecular and Cellular Proteomics 	journal	2.757 Q1	187
5 TrAC - Trends in Analytical Chemistry	journal	2.283 Q1	167
6 Analytical Chemistry	journal	2.117 Q1	332

Source : SJR

Top 7 /378 revues en Neurologie

All subject areas		Neurology (clinical)		All r	
☐	Only Open Access Journals	☐	Only SciELO Journals	☐	Only WoS Journals
Neurology (clinical)					
	Title	Type	↓ SJR	H index	
1	Lancet Neurology, The	journal	11.674 Q1	315	
2	Nature Reviews Neurology	journal	7.736 Q1	169	
3	JAMA Neurology	journal	6.278 Q1	243	
4	Acta Neuropathologica	journal	5.203 Q1	184	
5	Alzheimer's and Dementia	journal	5.059 Q1	135	
6	Molecular Neurodegeneration	journal	4.731 Q1	93	
7	Brain	journal	4.573 Q1	351	

Projets de recherche

- 1) Développement de l'imagerie nano-chimique corrélative (métaux/protéines) en **mode cryogénique**.
- 2) Interaction des **métaux physiologiques** (Cu et Zn) avec les protéines du **cytosquelette synaptique**.
- 3) **Neurotoxicité des métaux** (As, Cd, Pb, Hg, U et Mn) par déstabilisation des protéines du **cytosquelette**.
- 4) Métallation de la **SOD1** chez les patients **parkinsoniens**.

1. Développement de l'imagerie nano-chimique corrélative (métaux/protéines) en mode cryogénique

Objectifs :

- mettre en œuvre une imagerie corrélative cryogénique des métaux et des protéines dans les neurones à l'échelle nanométrique,
- en utilisant la microscopie à super-résolution cryo-PALM (Photoactivated localization microscopy) et la fluorescence X synchrotron (nano-SXRF),
- pour améliorer le protocole d'imagerie corrélative et l'étendre à l'imagerie de tout type de protéines.

Collaboration :

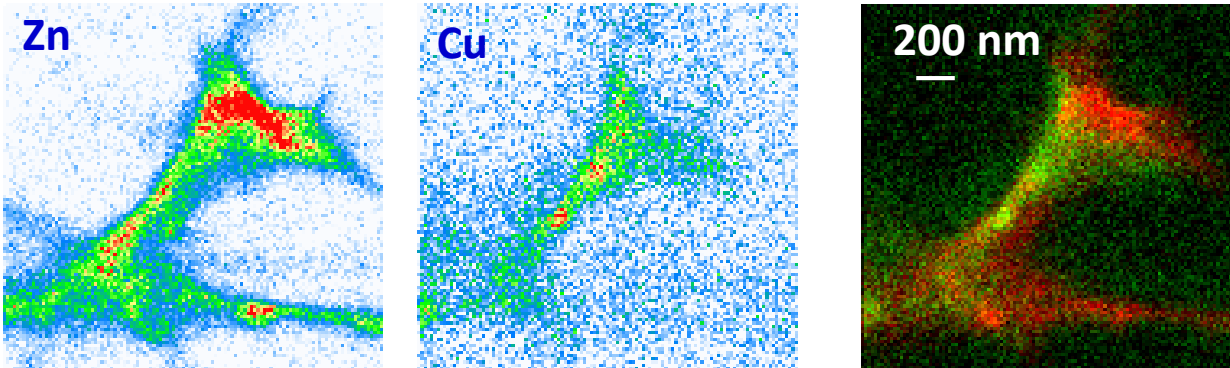
- M. Fernandez, BIC (Bordeaux Imaging Center), CNRS, Université de Bordeaux.

Financement :

- BIC, Bordeaux Imaging Center: EquipEx+ Nano-Cryo-CLEM (Correlative NanoImaging in cryogenic conditions) pour le développement d'un microscope Cryo-PALM.
- demande de bourse de thèse Univ. Bordeaux (jeune HDR, A. Carmona).

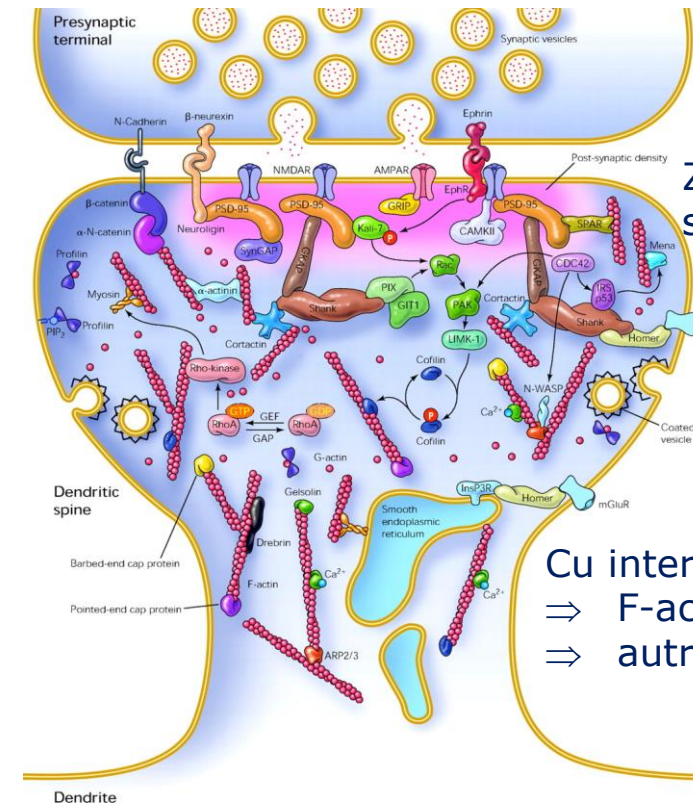
2. Interaction des métaux physiologiques (Cu et Zn) avec les protéines du cytosquelette synaptique

Zn (red) + Cu (green)



Répondre à de nouvelles questions:

- 1) Quelles sont les protéines qui fixent le Zn dans la densité post-synaptique ?
- 2) Le Cu interagit-il directement avec l'actine-F ou avec des protéines associées (cofiline, tropomyosine) ?
- 3) Quelles conséquences d'une déplétion en Cu ou Zn sur les connexions synaptiques ? Rôle dans Alzheimer ?



Zn et densité post-synaptique?

Cu interaction avec:
⇒ F-actine ?
⇒ autres ?

Zn et microtubules

~1 Zn par dimère tubuline- $\alpha\beta$

3. Neurotoxicité des métaux (As, Cd, Pb, Hg, U et Mn) par déstabilisation des protéines du cytosquelette

- **Contexte :**

- En corollaire des fonctions physiologiques des métaux endogènes, certains métaux exogènes pourraient altérer la structure des protéines du cytosquelette neuronal et conduire à la déstabilisation des connexions synaptiques.

- **Principaux objectifs**

- Décrire un nouveau mécanisme de neurotoxicité : **interaction directe des métaux avec l'architecture du cytosquelette synaptique.**
- Caractériser les interactions cellulaires et moléculaires de métaux neurotoxiques environnementaux (**As, Cd, Pb, Mn, Hg, U**) avec les protéines du cytosquelette synaptique (**tubuline, actine, ou protéines associées...**).
- Evaluer les stratégies de prévention impliquant des éléments essentiels (**Cu, Zn**).

- **Collaborations :**

- Daniel Choquet, IINS, Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, CNRS, Univ. Bordeaux.
- Véronique Malard, Laboratoire Interactions Protéine-Métal (CEA-CNRS, Cadarache).

- **Financement :**

- ANR SuperResMetToxSyn: Mécanismes de toxicité induits par les métaux environnementaux sur le cytosquelette synaptique : de l'imagerie à super-résolution à l'identification moléculaire.

4. Métallation de la SOD1 chez les patients parkinsoniens

- **Contexte :**

- Découverte d'un **déficit en Cu** dans la substantia nigra (SN), région du cerveau qui dégénère chez les patients parkinsoniens, en collaboration avec K. Double (Davies et al., 2014).
- Découverte de **l'agrégation de la SOD1** dans la substantia nigra des patients parkinsoniens et de la **modification du point isoélectrique de la SOD1** suggérant un **défaut de métallation** pouvant être à l'origine de son agrégation (Trist et al., 2017).
- Développement/validation d'un **protocole de séparation de la SOD1 en conditions natives pour mesurer le rapport Cu/Zn** à partir d'échantillons humains complexes (Roudeau et al., 2021).

- **Objectifs :**

- Mesurer le rapport Cu/Zn de la superoxyde dismutase à Cu,Zn (SOD1) chez les patients atteints de la maladie de Parkinson (Parkinson vs sujets sains, SN vs régions 'saines').
- L'agrégation de la SOD1 chez les patients parkinsoniens est-elle due à un défaut de métallation (déficit en Cu ou Zn) ?

- **Collaboration :**

- K. Double, Brain and Mind Centre and Discipline of Pharmacology, School of Medical Sciences, The University of Sydney, Australia.

Merci de votre attention