



## Transport et Neuro-toxicité des Métaux

### *TNT métaux*

Rapport de synthèse

Novembre 2010

Le projet *TNT métaux* a impliqué 4 équipes dont les coordonnées sont indiquées ci-dessous:

#### Liste des laboratoires et des responsables d'équipe

Laboratoire	Principal investigateur	Adresse électronique
Laboratoire de chimie et biologie des métaux UMR CNRS 5249 CEA, Grenoble	Alexandre Bouron <sup>1</sup>	alexandre.bouron@cea.fr
Grenoble Institut des Neurosciences Inserm U836 Grenoble	Alain Buisson	buisson@cyceron.fr
Laboratoire de neurooncologie et neuroinflammation Inserm U842 Faculté de Médecine RTH Laennec Lyon	Jean-François Gherzi-Egea	jean-francois.ghersi-egea@inserm.fr
Laboratoire de bioénergétique et biotechnologie des bactéries et microalgues, UMR CNRS 6191 CEA Cadarache	Pierre Richaud	pierre.richaud@cea.fr

---

<sup>1</sup> Coordinateur

## 1. Objectifs, situation du sujet

Dans un contexte de vieillissement des populations, comprendre l'impact de facteurs environnementaux sur la santé humaine de façon à élaborer des recommandations et des mesures préventives représente un des challenges majeurs en santé publique. Parmi ces facteurs figurent les métaux qui sont présents dans notre environnement quotidien (existence de gisements naturels, utilisation dans l'industrie des nanotechnologies, à des fins médicales dans de nombreux agents pharmacologiques, agents de contraste et radiopharmaceutiques, présence dans des cosmétiques, des emballages, métaux présents dans des particules générées par le trafic routier, les incinérateurs,...). Ils sont dispersés et se retrouvent ainsi dans l'air, l'eau et notre alimentation. Ils pénètrent dans l'organisme principalement via les voies respiratoires et digestives et plus rarement par voie cutanée. Certains métaux, comme le Cadmium (Cd), le Plomb (Pb), le Mercure (Hg) ou l'Aluminium (Al) n'ont pas de fonctions biologiques et exercent uniquement des actions toxiques. En revanche, de nombreux métaux comme le Fer (Fe), le Cuivre (Cu) ou le Zinc (Zn) sont vitaux car ils interviennent dans une myriade de processus biologiques (synthèse de l'ADN, transport d'oxygène par l'hémoglobine, fonction mitochondriale...). Leur concentration est très finement régulée et toute carence ou excès peut provoquer des dommages cellulaires et altérer les performances cognitives. Le cerveau présente la particularité d'accumuler, au cours du vieillissement, des métaux dans certaines de ses structures. Par exemple, une accumulation intracérébrale de manganèse (Mn), Fe, Cu et Zn est observée dans des zones spécifiques du cerveau chez le rat, la souris, mais aussi chez l'Homme. Par ailleurs, une perturbation de l'homéostasie d'éléments comme le Zn, le Fe ou le Cu est observée dans diverses pathologies neurologiques.

Le projet *TNT métaux* s'était fixé plusieurs objectifs: analyser la contribution de la barrière hémato-encéphalique et des plexus choroïdes dans l'apport au cerveau de métaux essentiels, comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans leur transport, leur accumulation au sein des cellules neurales, et leur neuro-toxicologie, en particulier leur impact sur le métabolisme d'APP, le précurseur du peptide beta-amyloïde. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au Manganèse, au Fer et au Zinc.

## 2. Matériels et méthodes

### Analyse du transport transmembranaire de métaux.

- Les mécanismes de transport au niveau des interfaces sang-cerveau ont été étudiés en utilisant des préparations ex vivo de micro-vaisseaux et de plexus choroïdes isolés, puis un modèle différencié de l'interface sang-liquide céphalorachidien (LCR) permettant la mesure de transport d'influx / d'efflux entre ces deux compartiments. L'adaptation des conditions d'utilisation de ces outils cellulaires à la détection des métaux par ICP-OES, font de ce couplage technologique un modèle original d'étude de la biodisponibilité cérébrale des métaux. L'analyse du transport transmembranaire au niveau des cellules neurales a été réalisée sur des lignées cellulaires (HEK-293 sauvages, HEK-293 sur-exprimant de façon stable soit le canal TRPC3 ou le canal TRPC6) ainsi que sur des neurones de cortex de souris embryonnaires maintenus en culture primaire.
- Les flux de métaux ont été analysés avec des sondes fluorescentes comme le FluoZin-3 (pour le zinc) et la calcéïne (pour le fer) ainsi qu'en électrophysiologie (expériences de patch-clamp).
- L'analyse de la distribution cellulaire des métaux a été réalisée avec la nanosonde synchrotron en imagerie de fluorescence X (cf figure ci-dessous).
- Quant aux dosages des métaux dans les échantillons biologiques, ils ont été réalisés avec des techniques spectroscopiques : spectroscopie d'absorption atomique (J. Arnaud CHU, Grenoble) et ICP-OES (P. Richaud, CEA Cadarache). Il est important de mentionner que l'apport de cette dernière technique a été essentiel au bon avancement du projet. En effet, le matériel disponible dans l'équipe de Pierre Richaud permet un enregistrement simultané d'une vingtaine d'éléments par échantillon et avec une haute sensibilité.

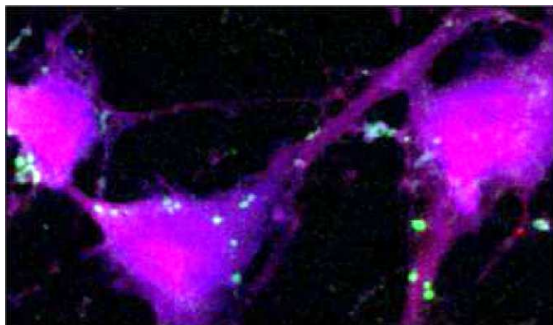
### 3. Principaux résultats scientifiques

#### 3.1 Etude du transport à travers les barrières (PI : J-F Gherzi-Egea, Lyon)

Le manganèse est un oligoélément essentiel mais une surexposition à ce métal induit un syndrome neurodégénératif. L'exposition environnementale ou médicale à ce métal induit une capture par les neurones activés, et une accumulation dans certaines structures du cerveau, notamment les noyaux de la base. Les voies et mécanismes d'entrée du manganèse dans le cerveau, première étape de l'accumulation et la neurotoxicité de ce métal, restent mal définis. Les métaux peuvent pénétrer dans le cerveau à travers l'endothélium des vaisseaux par des mécanismes de transport qui diffèrent en fonction de l'espèce étudiée. Des travaux anciens mettaient en exergue une accumulation de certains métaux lourds dans les plexus choroïdes, qui forment également une interface importante entre le sang et le système nerveux central. Nous avons développés des outils *ex vivo* et cellulaires adaptés aux études de capture et de transport des métaux, à travers ces interfaces, puis montré que le manganèse s'accumule dans les plexus choroïdes, siège de la barrière sang-LCR, sous une forme divalente non liée aux protéines. Cette accumulation est particulièrement élevée dans le cerveau en développement. En utilisant un modèle cellulaire différencié de cette interface, nous avons montré l'existence d'un transport actif et unidirectionnel de ce métal du sang vers le LCR, qui explique le transit du manganèse par le LCR observé par imagerie IRM avant son accumulation finale dans des structures définies du cerveau. Ce transport est inhibé par d'autres métaux dont le fer divalent, le plomb divalent, mais aussi l'aluminium, et par le calcium, qui est également transporté dans le LCR par un mécanisme de transport actif. Une altération des fonctions de neuroprotection assurée par la barrière choroïdienne est observée après une exposition basolatérale (face au sang) de ces cellules à des concentrations micromolaires de manganèse, à l'exception des capacités anti-oxydantes de cette interface qui sont conservées. Ces données définissent les bases anatomo-fonctionnelles liant l'exposition systémique au manganèse et à d'autres métaux avec leur accumulation cérébrale, et suggèrent qu'une altération des barrières du cerveau peut participer à la neurotoxicité de ces composés.

#### 3.2 Etude du transport à travers la membrane plasmique (PI : A. Bouron, Grenoble)

A ce jour de nombreux acteurs moléculaires ont été décrits comme pouvant participer au transport transmembranaire de métaux mais des travaux publiés ces dernières années ont mis en lumière le rôle jusque là insoupçonné de certaines protéines : les TRP (*Transient Receptor Potential*). En effet, plusieurs membres de cette famille comme TRPA1, TRPC6, TRPM3, TRPM7, et TRPML1 seraient impliqués dans le flux d'éléments traces (principalement le fer, le zinc, et le manganèse). Nous nous sommes intéressés au canal TRPC6 car des études *in vitro* avaient indiqué qu'il permettrait l'entrée de fer via un mécanisme indépendant de la transferrine. Nous avons pu confirmer que TRPC6 est effectivement perméable au fer. Or, l'entrée de ce métal dans les cellules (HEK ou neurones du cortex) change les concentrations de d'autres métaux comme le zinc, le cuivre et le manganèse. Ceci illustre le fait que la prise en charge d'un métal par les cellules peut modifier les processus homéostatiques de d'autres éléments. La figure ci-dessous illustre des expériences réalisées au synchrotron européen de Grenoble (ESRF) et montre la distribution intracellulaire du potassium (en violet) et du fer (en vert).



Contrairement au potassium, le fer est distribué de manière ponctiforme. L'entrée de fer à travers TRPC6 s'accompagne d'un enrichissement intracellulaire pour ce métal sans modifier sa distribution.

Outre le fer, les canaux TRPC6 sont aussi perméables au zinc. La surexpression du canal s'accompagne d'une surcharge intracellulaire en zinc, en soufre et d'une réduction du contenu en cuivre. Par ailleurs les cellules HEK sur-exprimant TRPC6 ont des pools de

zinc mobilisable de plus grandes tailles que les cellules HEK sauvages et elles sont également plus sensibles à un stress oxydant. Lors de notre travail sur le zinc neuronal, nous avons montré la coexistence dans les neurones du cortex de deux pools intracellulaires de zinc mobilisable : l'un au niveau des mitochondries et l'autre fixé aux métallothionéines. Par ailleurs, nos travaux nous ont

conduits à l'étude d'un médicament antidépresseur et nous avons pu démontrer, qu'au niveau cellulaire, il provoque la libération de zinc à partir de mitochondries. Un traitement chronique avec ce médicament stimule l'expression des gènes codant pour les métallothionéines.

La mise en évidence de la capacité des canaux TRPC6 à transporter du zinc, y compris lorsque la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  est mille fois supérieure (par exemple 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  vs 2  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ ), constitue une réelle avancée dans la mesure où TRPC6 apparaît comme un nouvel acteur participant à l'homéostasie cellulaire du zinc. Ceci va dans le même sens que des publications récentes montrant que certains canaux de type TRP peuvent transporter des métaux (Zn, Fe, Mn). Par ailleurs, nos observations confirment que les mitochondries sont des organelles capables de stocker mais aussi de libérer du zinc, notamment lors d'un stress. L'augmentation de la concentration en zinc libre peut exercer une action neurotoxique.

### **3.3 Fer et transmission synaptique, impact du fer sur le métabolisme d'APP (PI : A. Buisson, Caen)**

Le fer est indispensable au fonctionnement et au développement cérébral. En revanche, à des doses élevées, il présente une toxicité. Un certain nombre d'études ont montré que les mécanismes qui régulent le transport du fer, son absorption et son utilisation peuvent être affectés lors du vieillissement. L'accumulation progressive du fer dans le cerveau avec l'âge et le stress oxydatif induit par le fer peuvent causer ou aggraver des atteintes neurodégénératives. L'augmentation des concentrations de fer dans les neurones, les astrocytes et la microglie est généralement observée dans des régions qui sont particulièrement sensibles aux changements neuropathologiques qui caractérisent les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Au cours de ces trois années, nous avons étudié l'impact d'une exposition au fer sur le développement de la maladie d'Alzheimer. Pour cela nous avons utilisé des modèles cellulaires et des modèles animaux de maladie d'Alzheimer. Nos résultats montrent qu'une exposition au fer induit une augmentation des formes longues d'APP (APP-KPI), sans augmentation des formes courtes (APP695). Cette différence d'épissage n'est pas observée dans les cellules gliales exposées au fer. Ce résultat pose la question de l'implication des récepteurs NMDA (NMDAR), notamment les récepteurs extra-synaptiques, sur l'induction de l'expression des formes longues d'APP. Le blocage de cette augmentation par le MK-801 confirme cette hypothèse. Par ailleurs, l'exposition au fer peut déréguler l'homéostasie calcique ainsi que le fonctionnement des NMDAR. Ceci est le résultat d'une délocalisation des NMDAR depuis la synapse vers des sites extra-synaptiques. Le rôle des NMDAR synaptiques dans l'activation des défenses anti-oxydantes a été démontré. Une perte de récepteurs dans la synapse a donc des conséquences délétères par rapport à leur rôle vis-à-vis des atteintes radicalaires. De plus notre étude révèle que la sous unité NR2B du NMDAR est surexprimée en présence de fer, ce qui pourrait indiquer une adaptation des neurones pour acquérir plus du fer. Cette idée est renforcée par l'observation de l'effet d'une exposition au fer dans l'expression des facteurs d'épissage *sc35* et *hnRNPAI*. Après une activation extra-synaptique, l'effet d'une exposition au fer provoque une diminution dans l'expression des deux facteurs au niveau de leur ARN messager.

Les études *in vivo* ont apporté d'importantes informations complémentaires. Les résultats obtenus avec des souris jeunes, sans complications dans les processus de stockage et métabolisme du fer lié au vieillissement, montrent à quel point la régulation systémique du fer peut influencer le métabolisme de l'APP et la production d'A $\beta$  dans le cerveau. En effet, l'injection répétée de fer (pendant 1 mois à raison de 3 injections par semaine) chez des souris transgéniques APP/PS1, un modèle qui montre dès la jeunesse des dépôts des plaques séniles et des formes oligomériques d'A $\beta$ , révèle que le fer peut être un facteur impliqué non seulement dans l'initiation de la maladie mais aussi dans sa progression. Chez ces souris, on observe l'apparition précoce des déficits cognitifs caractéristiques de la maladie d'Alzheimer associés à la surcharge en fer au niveau cérébral. Ces résultats illustrent le rôle clé de la régulation du métabolisme du fer dans l'organisme (en particulier dans le cerveau) dans la maladie d'Alzheimer. En conclusion, nous avons pu démontrer que l'exposition au fer induisait une accélération des processus neuronaux (notamment par augmentation de la production neuronale de peptide amyloïde) à l'origine de la maladie d'Alzheimer. L'ensemble de ces résultats confirme l'influence néfaste d'une surcharge en fer chez des animaux développant la maladie d'Alzheimer.

#### 4. Liste des publications des équipes impliquées :

(figurent en orange les publications plus spécifiquement associées au projet mentionnant l'ANR grant n° SEST-3803):

##### 4.1 Articles parus et sous presse :

- Alix E, Schmitt C, Strazielle N, **Gherzi-Egea JF**. (2008) Prostaglandin E2 metabolism in rat brain: Role of the blood-brain interfaces. *Cerebrospinal Fluid Res.*, 5, 5-8.
- Belly A, Bodon G, Blot B, **Bouron A**, Sadoul R, Goldberg Y (2010). CHMP2B mutants linked to Fronto-temporal dementia impair maturation of dendritic spines. *J. Cell Sci.*, 123, 2943-2954.
- Bohic S, Gherzi-Egea JF, Gibon J, Paoletti P, Arnaud J, Hunot S, Boom A, Bouron A (2010). Rôles biologiques des éléments traces dans le cerveau – exemples du Zn et du Fe. *Revue Neurologique* (in press).
- Boisseau S, Kunert-Keil C, Lucke S, Bouron A (2009). Heterogeneous distribution of TRPC proteins in the embryonic cortex. *Histochem. Cell Biol.*, 131, 355-363.
- Bordji K, Becerril-Ortega J, Nicole O and Buisson A (2010). Activation of Extrasynaptic, but not Synaptic, NMDA Receptors Modifies Amyloid Precursor Protein Expression Pattern and Increases Amyloid- $\beta$  Production. *J. Neurosci.*, (in press).
- Gagnaire B, Adam-Guillermin C, Bouron A, Lestavel P (2010). The effects of radionuclides on animal behaviour. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (in press).
- Gazzin S, Strazielle N, Schmitt C, Fèvre-Montange M, Donald Ostrow J, Tiribelli C, Gherzi-Egea J-F (2008). Differential expression of the multidrug-resistance associated proteins Abcb1 and Abcc1 between blood-brain interfaces. *J Comp Neurol*, 510, 497-507.
- Gherzi-Egea JF, Gazzin S, Strazielle N. (2009). Blood-brain interfaces and bilirubin-induced neurological diseases. *Cur Pharm Des*, 15, 2893-907.
- Gherzi-Egea JF, Mönkkönen KS, Schmitt C, Honnorat J, Fèvre-Montange M, Strazielle N. Blood-brain interfaces and cerebral drug bioavailability. *Rev Neurol*, 165, 1029-38.
- Gibon J, Tu P, Frazzini V, Sensi S, Bouron A (2010). The thiol-modifying agent N-ethylmaleimide elevates the cytosolic concentration of free Zn<sup>2+</sup> but not of Ca<sup>2+</sup> in murine cortical neurons. *Cell Calcium*, 48, 37-43.
- Gibon J, Tu P, Bouron A (2010). Store-depletion and hyperforin activate distinct types of Ca<sup>2+</sup>-conducting channels in cortical neurons. *Cell Calcium*, 47, 538-543.
- Ginguené C, Champier J, Maallem S, Strazielle S, Jouvét A, Fèvre-Montange, M, **Gherzi-Egea, JF** (2010). P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) localize in the microvessels forming the blood-tumor barrier in ependymomas. *Brain Pathol*, 5, 926-35.
- Tu P, Gibon J, Bouron A (2010). The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria. *J. Neurochem.*, 12, 204-213.
- Tu P, Brandolin G, Bouron A (2009). The anti-inflammatory agent flufenamic acid depresses store-operated channels by altering mitochondrial calcium homeostasis. *Neuropharmacology*, 56, 1010-1016.
- Tu P, Kunert-Keil C, Lucke S, Brinkmeier H, Bouron A (2009). Diacylglycerol analogues activate second-messenger operated calcium channels exhibiting TRPC-like properties in cortical neurons. *J. Neurochem.*, 108, 126-138.

##### 4.2 Articles soumis pour publication :

- Tu P, Bohic S, de Samber B, Boulay G, Bouron A (2010). Iron entry through TRPC6 channels affects the cellular content of Zinc and Manganese in neurons. (submitted).
- Gibon J, Bohic S, Richaud P, Arnaud J, Zhu M, Boulay G, Bouron A (2010). TRPC6 channels favour the intracellular accumulation of zinc and regulate the pools of mobile zinc. (submitted).
- Schmitt C, Strazielle N, Richaud P, Bouron A, Gherzi-Egea JF. Active transport at the blood-cerebrospinal fluid barrier contributes to manganese influx into the brain. (Revision submitted).

- J. Becerril-Ortega, K. Bordji, O. Nicole and A. Buisson. (2010). Iron exposure triggers synaptic dysfunction and promotes neuronal production of amyloid  $\beta$  protein both in vitro and in vivo. (submitted).

## **5. Faits marquants, les retombées prévisibles et les perspectives de valorisation (y compris sociale, économique.....).**

L'une des originalités qui ont permis l'aboutissement de ce projet réside dans le regroupement de compétences multiples (chimistes, biochimistes, biologistes, pharmaciens) issus de divers organismes publics (CEA, CNRS, Inserm, Université) et d'avoir associé à ce travail une plate-forme technologique (Brain-i, Lyon. <http://ifnl.univ-lyon1.fr/nouveausite/index.php/fr/Plateformes/Plateformes-technologiques/Brain-i>). Celle-ci dispose d'un modèle unique de barrière sang-cerveau. Il est aussi nécessaire de signaler que l'apport des techniques spectrométriques a été essentiel aux dosages des métaux dans les échantillons biologiques. La pluridisciplinarité de nos approches peut également être illustrée par le fait qu'une partie du travail a été réalisée en collaboration avec des physiciens du synchrotron européen (ESRF, Grenoble), nécessitant la mise en place de nouvelles collaborations, au niveau national (S. Bohic, ESRF, Grenoble) et aussi internationale (B. de Samber, université de Gand, Belgique). L'étude de la prise en charge du zinc par les mitochondries a elle aussi été possible grâce à la mise en place d'une collaboration avec un collègue qui à l'origine n'était pas impliqué dans le projet (Stefano Sensi, Université de Chieti, Italie).

Ainsi, bien que fondamental en essence, ce projet a permis la mise en place de nouvelles collaborations et de développer des axes de recherche visant à une meilleure compréhension du risque lié à l'exposition des métaux, tant dans un contexte médical que fondamental. Ce projet a de plus déjà généré des retombées qui sont de deux ordres,

1) Il a suscité l'intérêt de la communauté scientifique, traduit par une représentation des équipes impliquées dans des symposiums dédiés lors de congrès internationaux, et a permis au coordinateur d'organiser un colloque national qui s'est tenu le 22 septembre 2009 à Minatec (Grenoble), sous l'égide de l'Institut des Métaux en Biologie de Grenoble (IMBG). Ce colloque avait pour but de présenter un état de l'art des connaissances relatives à la prise en charge des métaux à travers les barrières sang-cerveau, l'importance physiopathologique de certains métaux (Fer, Zinc, Manganèse, Sélénium) dans la physiologie neuronale et l'impact d'une carence ou d'une surcharge sur les cellules du système nerveux central, et les performances cognitives. Le compte rendu scientifique de ce colloque a donné lieu à un article (*Revue Neurologique*, sous presse).

2) Il a permis des contacts avec des sociétés industrielles pharmaceutiques et de réactifs de laboratoire. L'entreprise pharmaceutique Dr Schwabe AG, basée en Allemagne, qui commercialise l'antidépresseur hyperforine soutient le travail de caractérisation des effets cellulaires de ce composé. Elle fournit gratuitement les échantillons et apporte un soutien scientifique notamment dans l'élaboration des protocoles expérimentaux pour les expériences *in vivo* sur souris.

Il est par ailleurs nécessaire de souligner que ce projet suscite l'intérêt et le soutien de l'entreprise Molecular Probes (Invitrogen, USA) car celle-ci a décidé de fournir gratuitement la sonde fluorescente FluoZin-3 qu'elle a développé et qui est destinée à analyser les variations de la concentration en zinc libre dans le cytosol.

Divers étudiants ont été impliqués dans le projet et leurs travaux ont été réalisés dans le cadre d'un Master professionnel (Charlotte Schmitt, Master professionnel de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE), 2007-2008), de thèses d'université (Peng Tu, 2006-2009, Université Joseph Fourier Grenoble) (Javier Becerril Ortega, 2007-2010, Université de Caen), une troisième thèse étant en cours d'achèvement (Julien Gibon, 2008-2011, Université Joseph Fourier Grenoble).