



HAL
open science

Imagerie spectroscopique corrélative des métaux et des protéines : application à l'étude des processus de neurodégénérescence

Asuncion Carmona

► **To cite this version:**

Asuncion Carmona. Imagerie spectroscopique corrélative des métaux et des protéines : application à l'étude des processus de neurodégénérescence. Chimie analytique. Université de Bordeaux, 2022. tel-04157937

HAL Id: tel-04157937

<https://hal.science/tel-04157937>

Submitted on 10 Jul 2023

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

Habilitation à Diriger les Recherches

Présentée

A L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Ecole Doctorale des Sciences Chimiques

Spécialité : Chimie Analytique et Environnementale

Par Asuncion CARMONA

Chargée de recherche

**Imagerie spectroscopique corrélative des métaux et des
protéines : application à l'étude des processus de
neurodégénérescence**

Membres du jury

Marie-Pierre ISAURE, Maître de Conférence HDR, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Rapportrice

Yolanda PREZADO, Chargée de Recherche CNRS HDR, Institut Curie, Rapportrice

Sophie LECOMTE, Directrice de Recherche CNRS, Université de Bordeaux, Rapportrice

Richard ORTEGA, Directeur de Recherche CNRS, Université de Bordeaux, Garant

Clotilde POLICAR, Professeure, Ecole Normale Supérieure, Université Paris Sciences et Lettres, Examinatrice

Habilitation à Diriger les Recherches

Présentée

A L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Ecole Doctorale des Sciences Chimiques

Spécialité : Chimie Analytique et Environnementale

Par Asuncion CARMONA

Chargée de recherche

Imagerie spectroscopique corrélative des métaux et des protéines : application à l'étude des processus de neurodégénérescence

Membres du jury

Marie-Pierre ISAURE, Maître de Conférence HDR, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Rapportrice

Yolanda PREZADO, Chargée de Recherche CNRS HDR, Institut Curie, Rapportrice

Sophie LECOMTE, Directrice de Recherche CNRS, Université de Bordeaux, Rapportrice

Richard ORTEGA, Directeur de Recherche CNRS, Université de Bordeaux, Garant

Clotilde POLICAR, Professeure, Ecole Normale Supérieure, Université Paris Sciences et Lettres, Examinatrice

Sommaire

Préambule	1
Partie A. Curriculum Vitae.....	3
1. Fonction actuelle	3
2. Parcours professionnel antérieur	3
3. Titres	3
4. Publications	4
4.1 Revues à comité de lecture	4
4.2 Revues sans comité de lecture	9
4.3 Actes de colloques	9
4.4 Chapitre d'ouvrages.....	10
5. Encadrement	10
5.1 Post-Doctorants	10
5.2 Doctorant.....	10
5.3 Stages de formation.....	11
6. Communications.....	11
6.1 Conférences invitées dans des congrès internationaux.....	11
6.2 Communications dans des congrès, séminaires et conférences.....	12
7. Collaborations scientifiques	18
7.1 Internationales.....	18
7.2 Nationales	18
8. Participation à programmes de recherche.....	19
8.1 Principaux programmes de recherche auxquels j'ai participé	19
9. Autres responsabilités	20

Partie B. Bilan des activités de recherche	23
1. Introduction.....	23
2. Analyse par faisceau d'ions	24
2.1 La plateforme AIFIRA et la ligne de haute résolution spatiale	24
2.2 Techniques PIXE et RBS	26
2.3 Exemple d'application cellulaire : toxicité pulmonaire du Co	30
2.4 Exemple d'application aux tissus : imagerie intratumorale du Gd.....	34
3. Imagerie par rayonnement synchrotron.....	37
3.1 Caractéristiques d'une installation synchrotron	37
3.2 Fluorescence de rayons X par synchrotron (SXRF) et Spectroscopie de structure près du seuil d'absorption des rayons X (XANES)	38
3.3 Lignes de lumière synchrotron	40
a. Anciennes lignes de lumière à l'ESRF	41
b. ID21 à l'ESRF.....	42
c. Nanoscopium à SOLEIL	42
d. P06 à DESY.....	43
e. ID16A à l'ESRF	43
f. Ligne 9-ID-B (Bionanoprobe) à l'APS.....	44
4. La microscopie photonique : marquage des protéines.....	45
4.1 Lumière transmise	45
4.2 Microscopie à fluorescence	46
a. La microscopie à épifluorescence	47
b. La microscopie à super résolution STED	49
5. Préparation des échantillons.....	51
5.1 La culture cellulaire.....	52
5.2 Fixation chimique.....	53
5.3 Méthodes cryogéniques	55
a. Le rinçage du milieu de culture	55
b. La cryofixation (ou <i>plunge-freezing</i>)	57
c. La lyophilisation (<i>freeze-drying</i>)	58

6. Imagerie corrélative métaux-protéines	59
6.1 Imagerie corrélative dans les cellules/neurones	59
6.2 Imagerie corrélative dans les tissus biologiques	63
7. Applications : métaux et neurodégénérescence.....	66
7.1 La neurotoxicité du manganèse	66
a. Localisation du Mn dans l'appareil de Golgi : mise en évidence indirecte.....	66
b. Imagerie corrélative du Mn et de l'appareil de Golgi et spéciation subcellulaire.....	68
c. Formes familiales de parkinsonisme : accumulation du Mn dans l'appareil de Golgi.....	70
d. Validation de la localisation d'un senseur fluorescent du Mn	73
7.2 Fer et maladie du Parkinson	75
a. Modèle animal	76
b. Fer et synucléine dans les cellules	78
c. Fer et <i>Lewy bodys</i> dans des tissus humains	81
7.3 Neurotoxicité de l'uranium naturel.....	84
a. Imagerie PIXE de l'uranium	85
b. Imagerie corrélative SXRF et épifluorescence des organites	87
7.4 Cu et Zn et le cytosquelette neuronal	90
a. Premières indications de l'interaction du Cu et du Zn avec le cytosquelette neuronal.....	90
b. Imagerie SXRF de neurones primaires	92
c. Imagerie corrélative à super-résolution des métaux et des protéines du cytosquelette neuronal.....	94

Partie C. Projet de recherche et conclusions 101

1. Projet de recherche : cryocorrélative.....	101
1.1 Cryofixation.....	102
1.2 Cryocorrélative : épifluorescence-SXRF.....	103
1.3 Cryocorrélative : cryo-PALM et nano-SXRF	105
1.4 Applications	106
2. Conclusions.....	109

Partie D. Références 111

Préambule

J'écris ce mémoire dans le cadre de ma demande d'habilitation à diriger des recherches à l'école doctorale de Sciences chimiques de l'Université de Bordeaux. Je tiens à préciser que pendant mes études universitaires j'ai suivi une formation en physique et que mon titre de docteur a également été délivré dans cette matière. Cependant, dès mon arrivée en France, au laboratoire de Chimie nucléaire analytique & bioenvironnementale (CNAB) à Bordeaux, j'ai embrassé et plus jamais quitté cette discipline qu'est la chimie analytique. Depuis que j'ai été recrutée en section 13 du CNRS (chimie physique, théorique et analytique) je travaille au sein d'une équipe interdisciplinaire, l'équipe ICS (Imagerie Chimique et Spéciation). Nos recherches se fondent sur l'utilisation des techniques de spectrométrie, comme la spectroscopie de fluorescence des rayons X, avec pour but de comprendre le rôle et les mécanismes de toxicité des métaux dans les systèmes biologiques, avec un intérêt particulier pour les métaux impliqués dans les maladies dégénératives. Je postule à une HDR en chimie parce que j'estime que, pour mes recherches, l'encadrement de jeunes chimistes serait pertinent, avec par exemple, un encadrement de thèse dans les spécialités de l'école doctorale chimie analytique ou chimie et technologies pour le vivant.

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury. Merci à Yolanda Prezado, dont j'admire beaucoup la réussite, pour le courage dont elle a fait preuve en quittant l'Espagne, où elle occupait un poste hospitalier, pour poursuivre sa vocation de chercheuse, d'abord à l'ESRF, puis au CNRS, à l'Institut Curie à Paris.

Merci à Marie-Pierre Isaure, que je connais depuis longtemps par l'intermédiaire de Richard. Elle est calme, agréable et totalement passionnée par ses travaux de recherche, qu'elle combine avec l'enseignement sans jamais se plaindre. Je partage avec elle l'utilisation des techniques d'analyse synchrotron et de préparation cryogénique.

Je tiens à remercier Sophie Lecomte d'avoir accepté sans hésitation d'être rapportrice. Et ce, malgré toutes ses fonctions de directrice du laboratoire de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets. J'espère sincèrement que nous pourrons envisager des collaborations conjointes sur l'étude des maladies neurodégénératives, en combinant ses recherches sur l'implication de certaines protéines et notre expertise dans la détermination des métaux.

Je suis reconnaissante à Clotilde Policard d'avoir accepté de faire partie du jury. Je sais qu'elle a de nombreuses obligations professionnelles notamment en tant que professeure et directrice des études à l'Ecole Normale Supérieure. Son équipe de recherche est très active sur des sujets proches des nôtres, comme l'étude des métalloprotéines et l'utilisation des techniques d'imagerie synchrotron. J'espère donc que cette HDR servira de point de départ à des projets communs.

Et je remercie Richard Ortega, mon mentor. Il m'a toujours fait confiance et m'a encouragé pour mon concours CNRS en 2008, et aussi aujourd'hui pour mon HDR. Il est convaincu que les métaux jouent un rôle très important dans le fonctionnement du cerveau et il le démontre dans chaque publication, dans chaque demande de financement, lors des conférences, mais aussi dans sa vie quotidienne. Son enthousiasme de chercheur déborde de partout. Merci Richard pour ta patience, tu sais que sans toi je ne serais pas là où je suis aujourd'hui et je n'aurais pas fait tout ce que j'ai fait, tout ce que nous avons fait.

Ce mémoire de demande d'habilitation à diriger des recherches est structuré en cinq parties. Tout d'abord je présente mon curriculum vitæ détaillé, avec notamment la liste des publications scientifiques que j'ai produites et les conférences dans lesquelles ces travaux ont été diffusés. Dans cette partie, j'énumère aussi les étudiants que j'ai pu encadrer pendant toutes ces années et la position actuelle pour certains d'entre eux. Dans un deuxième temps, je fais un bilan de mes recherches depuis que je travaille au CNRS. Je présente les objectifs de mes recherches au sein de mon équipe, les techniques analytiques que nous utilisons ainsi que les processus de préparation des échantillons et de corrélation d'images que nous développons. À la fin de cette partie, je développe quelques projets avec lesquels j'illustre les capacités et les limites de nos techniques d'analyse, ce que nous ont apporté les avancées techniques et comment nous les avons adaptées à chaque étape et bien évidemment les résultats majeurs que nous avons mis en évidence. Dans la troisième partie, j'expose mon futur projet de recherche. Comment la réalisation de ce projet devient cruciale et inévitable dans l'avancement de mes recherches avec les outils actuels, comment la mise en œuvre de ce projet pourra nous aider à approfondir notre compréhension du rôle des métaux dans les systèmes biologiques. Ensuite je présente les conclusions que je retiens après avoir fait cette synthèse de mes activités. Finalement, dans la quatrième et dernière partie, je liste les références les plus importantes sur lesquelles je me suis appuyée, dont je me suis inspirée et avec lesquelles j'ai acquis d'innombrables connaissances.

Dans ce document vous constaterez que j'écris parfois à la première personne du singulier et d'autres à la première personne du pluriel. Cela est dû au fait que ces projets et ces recherches ont été réalisés avec mon équipe et mes collaborateurs sans lesquels ils n'auraient pas vu le jour. J'ai du mal – et je ne veux pas non plus – me détacher d'eux pour rédiger ce mémoire parce qu'ils m'ont accompagnée, indéniablement, dans mon esprit. Ainsi, considérez ce mémoire comme le fruit d'un travail commun dont j'ai fait la synthèse en présentant les parties dans lesquelles mon implication a été prépondérante.

Partie A. Curriculum Vitae

Asunción CARMONA LUQUE

Née le 11 Septembre 1978 à Montalbán de Córdoba (Espagne).

Nationalité Espagnole

1. Fonction actuelle

Chargée de Recherche CNRS Classe Normale depuis 2008.

Institut de chimie, Section 13 : Chimie physique, théorique et analytique

Affectation : Laboratoire de Physique des 2 Infinis de Bordeaux

UMR5797-CNRS-Université de Bordeaux

19 Chemin du solarium, 33170 Gradignan, France

Tél : + (33) 557 120 908

Email : asuncion.carmona@u-bordeaux.fr

2. Parcours professionnel antérieur

Juin 2007-Octobre 2008, **Chercheuse (post-doctorat)** au CNRS, laboratoire de **Chimie Nucléaire Analytique & Bioenvironnementale** (CNAB) à Bordeaux, France, sous la direction du Dr R. Ortega. Le titre de mon projet était « Multimodal chemical imaging using ion beam analyses and synchrotron radiation for inorganic elements speciation in biological samples ».

3. Titres

Juillet 2005-Mars 2007, **Doctorat en Physique**. Réalisé au Centre National d'Accélérateurs (CNA), à l'Université de Séville, Espagne, sous la direction du Dr M. Respaldiza. Le titre de ma thèse était « Distribución de elementos químicos en células neuronales mediante técnicas nucleares de análisis ».

Mai 2002-Juillet 2005, **DEA en Physique**. Réalisé au Centre National d'Accélérateurs (CNA), à l'Université de Séville, Espagne, sous la direction du Dr M. Respaldiza. Mon travail du DEA portait le titre de « Determinación cuantitativa de fármacos a base de platino en tumores cerebrales de rata mediante aceleradores de partículas ».

Septembre 1996-Juin 2001, **Master en Physique**. Université de Cordoue, Espagne.

4. Publications

Depuis que je travaille dans la recherche j'ai participé à 50 publications dans des revues à comité de lecture dont 11 comme première auteur. Ces travaux ont été cités plus de 1700 fois avec un indice-h de 21 (Source Google Scholar Juillet 2022). Je suis co-auteure de 3 articles dans des revues sans comité de lecture, 8 comptes-rendus de conférences avec comité de lecture et 2 chapitres d'ouvrages.

4.1 Revues à comité de lecture

2022

Trist BG, Genoud S, Roudeau S, Rookyard A, Abdeen A, Cottam V, Hare DJ, White M, Altvater J, Fifita JA, Hogan A, Grima N, Blair IP, Kysenius K, Crouch PJ, **Carmona A**, Rufin Y, Claverol S, Van Malderen S, Falkenberg G, Paterson DJ, Smith B, Troakes C, Vance C, Shaw CE, Al-Sarraj S, Cordwell S, Halliday G, Ortega R, Double KL. (2022) Altered SOD1 maturation and post-translational modification in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *Brain*, awac165.

Ortega R., **Carmona A.** (2022) Neurotoxicity of Environmental Metal Toxicants: Special Issue. *Toxics*, 10, 382.

Carmona A., Chen S., Domart F., Choquet D., Ortega R. (2022) Imaging the structural organization of chemical elements in growth cones of developing hippocampal neurons. *Metallomics*, 14(1), mfab073.

2021

Carmona A., Roudeau S., Ortega R. (2021) Molecular mechanisms of environmental metal neurotoxicity: focus on the interactions of metals with synapse structure and function. *Toxics*, 9(9), 198.

Roudeau S., Trist B., **Carmona A.**, Davies K., Halliday G., Rufin Y., Claverol S., Van Malderen S., Falkenberg G., Double K., Ortega R. (2021). Native separation and metallation analysis of SOD1 protein from the human central nervous system: a methodological workflow. *Analytical Chemistry*, 93, 32, 11108–11115.

Carmona A., Porcaro F., Somogyi A., Roudeau S., Domart F., Medjoubi K., Aubert M., Isnard H., Nonell A., Rincel A., Paredes E., Vidaud C., Malard V., Bresson C., Ortega R. (2021). Cytoplasmic aggregation of uranium in human dopaminergic cells after continuous exposure to soluble uranyl at non-cytotoxic concentrations. *NeuroToxicology*, 82, 35-44.

Mitchell E.J., Frisbie S.H., Roudeau S., **Carmona A.**, Ortega R. (2021). How much manganese is safe for infants? A review of the scientific basis of intake guidelines and regulations relevant to the manganese content of infant formulas. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 65, 126710.

2020

Domart F., Cloetens P., Roudeau S., **Carmona A.**, Verdier E., Choquet D., Ortega R. (2020). Correlating STED and synchrotron XRF nano-imaging unveils cosegregation of metals and cytoskeleton proteins in dendrites. *eLife*, 9, e62334.

Mitchell E.J., Frisbie S.H., Roudeau S., **Carmona A.**, Ortega R. (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*, 62:126607.

2019

Frisbie S.H., Mitchell E.J., 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. *PLoS ONE*, 14 (11) : e0223636.

Carmona A., Roudeau S., Perrin L., Carcenac C., Vantelon D., Savasta M., Ortega R. (2019). Mapping chemical elements and iron oxidation states in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine lesioned rats using correlative immunohistochemistry with proton and synchrotron micro-analysis. *Frontiers in Neuroscience*, 13:1014.

Das S., **Carmona A.**, Khatua K., Porcaro F., Somogyi A., Ortega R., Datta A. (2019). Manganese mapping using a fluorescent Mn²⁺ sensor and nanosynchrotron X-ray fluorescence reveals the role of the Golgi apparatus as a manganese storage site. *Inorganic Chemistry*, 58 (20), 13724-13732.

Das S., Khatua K., Rakshit A., **Carmona A.**, Sarkar A., Bakthavatsalam S., Ortega R., Datta A. (2019). Emerging chemical tools and techniques for tracking biological manganese. *Dalton Transactions*, 48 (21), 7047-7061.

Carmona A., Zogzas C.E., Roudeau S., Porcaro F., Garrevoet J., Spiers K., Salome M., Cloetens P., Mukhopadhyay S., Ortega R. (2019). SLC30A10 mutation involved in parkinsonism results in manganese accumulation within nano-vesicles of the Golgi apparatus. *ACS Chemical Neuroscience*, 10 (1), 599-609.

2018

Carmona A., Malard V., Avazeri E., Roudeau S., Porcaro F., Paredes E., Vidaud C., Bresson C., Ortega R. (2018). Uranium exposure of human dopaminergic cells results in low cytotoxicity, accumulation within sub-cytoplasmic regions, and down regulation of MAO-B. *NeuroToxicology*, 68, 177-188.

Porcaro F., Roudeau S., **Carmona A.**, Ortega R. (2018). Advances in element speciation analysis of biomedical samples using synchrotron-based techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, 104, 22-41.

2017

Trist B.G., Davies K.M., Cottam V., Genoud S., Ortega R., Roudeau S., **Carmona A.**, De Silva K., Wasinger V., Lewis S.J.G., Sachdev P., Smith B., Troakes C., Vance C., Shaw C., Al-Sarraj S., Ball H.J., Halliday G.M., Hare D.J., Double K.L. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis-like superoxide dismutase 1 proteinopathy is associated with neuronal loss in Parkinson's disease brain. *Acta Neuropathologica*, 134 (1), 113-127.

Perrin L., Roudeau S., **Carmona A.**, Domart F., Petersen J.D., Bohic S., Yang Y., Cloetens P., Ortega R. (2017). Zinc and copper effects on stability of tubulin and actin networks in dendrites and spines of hippocampal neurons. *ACS Chemical Neuroscience*, 8 (7), 1490-1499.

Carmona A., Roudeau S., L'Homel B., Pouzoulet F., Bonnet-Boissinot S., Prezado Y., Ortega R. (2017). Heterogeneous intratumoral distribution of gadolinium nanoparticles within U87 human glioblastoma xenografts unveiled by micro-PIXE imaging. *Analytical Biochemistry*, 523, 50-57.

Edou-Minko A., Moussavou M., Sato T., Tchikoundzi C., Sawaki Y., Ndong Ondo S., Ortega R., Maire R., Kaestner A., Mbina MOUNGUENGUI M., Roudeau S., Fleury G., **Carmona A.**, de Parseval Ph., Mvoubou M., Moussavou B.M., Agondjo M.O., Sasaki O., Maruyama S. (2017). An Akouemma hemisphaeria organic microfossils colony hosting biodiversity assemblage on the seafloor of Okondja Basin (Gabon) dated at 2.2 Ga. *Journal of Geology and Geophysics*, 6, 2.

Edou-Minko A., Moussavou M., Sato T., Sawaki Y., Ndong Ondo S., Maire R., Fleury G., Mbina MOUNGUENGUI M., Kaestner A., Ortega R., Roudeau S., **Carmona A.**, Mvoubou M., Moussavou B.M., Sasaki O., Maruyama S. (2017). Growth, duplication and lateral mutual compressive deformation of Akouemma hemisphaeria on the seafloor of Okondja Basin at 2.2 Ga (Gabon). *International Journal of Geosciences*, 8 (9), 1172-1191.

2016

Ortega R., **Carmona A.**, Roudeau S., Perrin L., Dučić T., Carboni E., Bohic S., Cloetens P., Lingor P. (2016). α -Synuclein over-expression induces increased iron accumulation and redistribution in iron-exposed neurons. *Molecular Neurobiology*, 53 (3), 1925-1934.

2015

Perrin L., **Carmona A.**, Roudeau S., Ortega R. (2015). Evaluation of sample preparation methods for single cell quantitative elemental imaging using proton or synchrotron radiation focused beams. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30 (12), 2525-2532.

Roudeau S., Chevreux S., **Carmona A.**, Ortega R. (2015). Reduced net charge and heterogeneity of pI isoforms in familial amyotrophic lateral sclerosis mutants of copper/zinc superoxide dismutase. *Electrophoresis*, 36 (19), 2482-2488.

Moussavou M., Edou-Minko A., Mbina MOUNGUENGUI M., Ortega R., Fleury G., Roudeau S., **Carmona A.**, Genty D., Blamart D., Tchikoundzi C., Makaya Mvoubou., Musavu Moussavou B., Ndong Ondo., Ogandaga Agondjo M., Dewilde F., Delorme G., de Parseval Ph., Weil R., Maire R. (2015). Multicellular Consortia Preserved in Biogenic Ductile-Plastic Nodules of Okondja Basin (Gabon) by 2.1 Ga. *Journal of Geology & Geophysics*, 4 (195), 2.

Gil S., **Carmona A.**, Martínez-Criado G., León A., Prezado Y., Sabés M. (2015). Analysis of platinum and trace metals in treated glioma rat cells by X-ray fluorescence emission. *Biological Trace Element Research*, 163 (1-2), 177-183.

2014

Roudeau S., **Carmona A.**, Perrin L., Ortega R. (2014). Correlative organelle fluorescence microscopy and synchrotron X-ray chemical element imaging in single cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (27), 6979-6991.

Ortega R., Bresson C., Darolles C., Gautier C., Roudeau S., Perrin L., Janin M., Floriani M., Aloin V., **Carmona A.**, Malard V. (2014). Low-solubility particles and a Trojan-horse type mechanism of toxicity : the case of cobalt oxide on human lung cells. *Particle & Fibre Toxicology*, 11, 14.

Carmona A., Roudeau S., Perrin L., Veronesi G., Ortega R. (2014). Environmental manganese compounds accumulate as Mn(II) within the Golgi apparatus of dopamine cells : relationship between speciation, subcellular distribution, and cytotoxicity. *Metallomics*, 6 (4), 822-832.

Davies K.M., Bohic S., **Carmona A.**, Ortega R., Cottam V., Hare D.J., Finberg J.P.M., Reyes S., Halliday G.M., Mercer J.F.B, Double K.L., (2014). Copper pathology in vulnerable brain regions in Parkinson's disease. *Neurobiology of Ageing*, 35 (4), 858-866.

Matsuyama S., Ishii K., Watanabe K., Terakawa A., Kikuchi Y., Fujiwara M., Sugai H., Karahashi M., Nozawa Y., Yamauchi S., Fujisawa M., Ishiya M., Nagaya T., Ortega R., **Carmona A.**, Roudeau S. (2014). Improvement and recent applications of the Tohoku microbeam system. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 318, 32-36.

Matsuyama S., Ishii K., Toyama S., Watanabe K., Koshio S., Kasahara K., Ito S., Terakawa A., Fujikawa M., Suzuki Y., **Carmona A.**, Roudeau S., Ortega R. (2014). 3D imaging of human cells by using PIXE μ CT. *International Journal of PIXE*, 24 (01n02), 67-75.

2013

Bresson C., Darolles C., **Carmona A.**, Gautier C., Sage N., Roudeau S., Ortega R., Ansoborlo E., Malard V. (2013). Cobalt chloride speciation, mechanisms of cytotoxicity on human pulmonary cells, and synergistic toxicity with zinc. *Metallomics*, 5 (2), 133-143.

2012

Ortega R., **Carmona A.**, Llorens I., Solari P.L. (2012). X-ray absorption spectroscopy of biological samples. A tutorial. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27 (12), 2054-2065.

Ortega R., **Carmona A.** (2012). High spatial resolution chemical imaging of inorganic and organometallic pesticides. *Journal of Environmental Analytical Toxicology*, S4-005.

Chevreux S., Llorens I., Solari P.-L., Roudeau S., Devès G., **Carmona A.**, Testemale D., Hazemann J.L., Ortega R. (2012). Coupling of native IEF and Extended X-ray Absorption Fine Structure to characterize zinc binding sites from pI isoforms of SOD1 and A4V pathogenic mutant. *Electrophoresis*, 33 (8), 1276-1281.

Kosior E., Bohic S., Suhonen H., Ortega R., Devès G., **Carmona A.**, Marchi F., Guillet J.F., Cloetens P. (2012). Combined use of hard X-ray phase contrast imaging and X-ray fluorescence microscopy for subcellular metal quantification. *Journal of Structural Biology*, 177 (2), 239-247.

2010

Carmona A., Devès G., Roudeau S., Cloetens P., Bohic S., Ortega R. (2010). Manganese accumulates within Golgi apparatus in dopaminergic cells as revealed by synchrotron X-Ray fluorescence nano-imaging. *ACS Chemical Neurosciences*, 1 (3), 194-203.

2009

Chevreux S., Roudeau S., Fraysse A., **Carmona A.**, Devès G., Solari P.-L., Mounicou S., Lobinski R., Ortega R. (2009). Multimodal analysis of metals in copper-zinc superoxide dismutase isoforms separated on electrophoresis gels. *Biochimie* 91 (10), 1324-1327.

Ortega R., Devès G., **Carmona A.** (2009). Bio-metals imaging and speciation in cells using proton and synchrotron radiation X-ray micro-spectroscopy. *J. R. Soc. Interface* 6 (suppl_5), S649–S658.

Devès G., Roudeau S., **Carmona A.**, Lavielle S., Gionnet K., Déléris G., Ortega R. (2009). Fluorine micro-imaging and quantification using nuclear reaction analysis : a new tool for tissue distribution validation of positron emission tomography tracers. *Applied Physics Letters* 95 (2), 023701.

Kawamura Y., Ishii K., Matsuyama S., Nakhostin M., Fujiwara M., Tsuboi S., Yamanaka K., Watanabe M., Okura S., Hashimoto Y., Fujikawa M., Hatori Y., Hamada N., Fujiki K., Yamazaki H., Ortega R., Deves G., **Carmona A.** (2009). 3D imaging of human cells by using PIXE- μ -CT. *International Journal of PIXE*, 19 (01n02), 29-37.

2008

Chevreux S., Roudeau S., Fraysse A., **Carmona A.**, Devès G., Solari P.L., Weng T.C., Ortega R. (2008). Direct speciation of metals in copper-zinc superoxide dismutase isoforms on electrophoresis gels using X-ray absorption near edge structure. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (8), 1117-1120.

Carmona A., Cloetens P., Devès G., Bohic S., Ortega R. (2008). Nano-imaging of trace metals by synchrotron X-ray fluorescence into dopaminergic single cells and neurite-like processes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (8), 1083-1088.

Carmona A., Devès G., Ortega R. (2008). Quantitative micro-analysis of metal ions in subcellular compartments of cultured dopaminergic cells by combination of three ion beam techniques. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 390 (6), 1585-1594.

Respaldiza M.A., Ager F.J., **Carmona A.**, Ferrer J., García M., García J., García I., Gómez B., Morilla Y., Ontalba M.A., Ortega I. (2008). Accelerator-based research activities at "Centro Nacional de Aceleradores", Seville (Spain). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 266, 2105-2109.

2007

Ortega R., Cloetens P., Devès G., **Carmona A.**, Bohic S. (2007). Iron storage within dopamine neurovesicles revealed by chemical nano-imaging. *PLoS ONE*, 2(9), e925.

Bacquart T., Devès G., **Carmona A.**, Tucoulou R., Bohic S., Ortega R. (2007). Subcellular speciation analysis of trace element oxidation states using synchrotron radiation micro-X-ray absorption near edge structure. *Analytical Chemistry*, 79 (19), 7353-7359.

2006

Wierzchos J., Ascaso C., Ager F.J., García I., **Carmona A.**, Respaldiza M.A. (2006). Identifying elements in rocks from the Dry Valleys desert (Antarctica) by ion beam proton induced X-ray emission. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 249, 571-574.

2005

Ortega R., Biston M.C., Devès G., Bohic S., **Carmona A.** (2005). Nuclear microprobe determination of platinum quantitative distribution in rat brain tumors after cisplatin or carboplatin injection for PAT treatment of glioma. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 231, 321-325.

4.2 Revues sans comité de lecture

Carmona A., Cloetens P., Devès G., Bohic S., Ortega R. (2008). Nano-imaging of trace metals by synchrotron X-ray fluorescence into dopaminergic single cells and neurite-like processes. *Virtual Journal of Chemical Biology*, 9.

Chevreux S., Roudeau S., Fraysse A., **Carmona A.**, Devès G., Solari P.L., Weng T.C., Ortega R. (2008). Direct speciation of metals in copper-zinc superoxide dismutase isoforms on electrophoresis gels using X-ray absorption near edge structure. *Virtual Journal of Chemical Biology*, 9.

4.3 Actes de colloques

Carmona A., Zogzas C., Roudeau S., Porcaro F., Garrevoet J., Spiers K., Salomé M., Cloetens P., Mukhopadhyay S., and Ortega R. (2019) SLC30A10 mutation involved in parkinsonism results in manganese accumulation within nano-Vesicles of the Golgi apparatus revealed by synchrotron X-Ray fluorescence imaging. *The Toxicologist, Supplement to Toxicological Sciences*, 168 (1), 94.

Trist B., Davies K., Cottam V., Genoud S., Ortega R., Roudeau S., **Carmona A.**, Silva D.K., Wasinger V., Halliday G., Hare D., Double K. (2017). Novel superoxide dismutase-1 proteinopathy is associated with Lewy pathology and neuronal loss in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 142, 111-111

Trist B.G., Davies K.M., Genoud S., Smoothy V., Halliday G.M., Roudeau S., **Carmona A.**, Perrin-Verdugier L., Ortega R., Double K.L. (2016). Sod1 aggregation : A pathological link between Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis ?. *Movement Disorders*, 31, S241-S242.

Ortega R., Roudeau S., Perrin L., **Carmona A.** (2016) Correlative Chemical Element Imaging in Cells Using Fluorescence Microscopy and Synchrotron X-ray Fluorescence. *Microscopy and Microanalysis* 22 (S3), 1094-1095.

Carmona A., Roudeau S., Ortega R., Pouzoulet F., Prezado Y. (2016) Particle Induced X-ray Emission Imaging of Gadolinium Distribution into Xenograft U87 Human Glioblastoma after AGuIX Nanoparticles Injection. *Microscopy and Microanalysis* 22 (S3), 210-211.

Trist B., Davies K.M., Genoud S., Smoothy V., Halliday G.M., Roudeau S., **Carmona A.**, Perrin-Verdugier L., Ortega R., Double K.L. (2016) SOD1 aggregation: A pathological link between Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis? *Movement Disorders*, 31, S241-S242. Bresson C., Darolles C., **Carmona A.**, Gautier C., Sage N., Roudeau S., Ortega R., Ansoberlo E., Malard V. (2013). Cobalt chloride speciation, mechanisms of cytotoxicity on human pulmonary cells, and synergistic toxicity with zinc. *Toxicology Letters*, 221, S167-S168. 49th Congress of the European-Societies-of-Toxicology (EUROTOX)

Bohic S., Carmona A., Ortega R., Reyes S., Carew-Jones F., Double K. (2009). P3. 052 Metallomics of neuromelanin in Parkinsonian syndromes. *Parkinsonism & Related Disorders* 15, S161-S162.

4.4 Chapitre d'ouvrages

Ortega R., Carmona A. Golgi apparatus functions in manganese homeostasis and detoxification. In: Golgi apparatus: Structure, Functions and Mechanisms. Ed: Christopher J. Hawkins, Nova Science Publishers, Inc., New York pp.151-160. ISBN 978-1-61122-051-3, 2011.

Ager F.J., Carmona A., Ferrer F.J., García-López J., García-Orellana I., Gómez-Tubío B., Morilla Y., Ontalba M.A., Respaldiza M.A., Ynsa M.D. Caracterización de materiales mediante técnicas IBA en el Centro Nacional de Aceleradores, In : Avances en Ciencia y Tecnología del Acero Inoxidable II, Eds. J.A. Odriozola, J. Botella, C. Merino, pp. 309-316, 2003.

5. Encadrement

5.1 Post-Doctorants et visiteurs scientifiques

-2017-2019. Co-responsable du post doctorat de Dr Francesco PORCARO. « Imagerie chimique par faisceau d'ions de la distribution neuronal de l'uranium ». Université de Bordeaux. Publications : 5. Communications : 9. Actuellement attaché de recherche clinique dans la société Covance en Italie.

-2017 (3 mois). Co-encadrement visiteur scientifique, Dr Erin MCALLUM. The Florey Institute of Neuroscience, Université de Melbourne, Australie. « Metals and protein aggregation in neurodegenerative disease ».

-2010-2015. Co-responsable du post doctorat de Dr Laura PERRIN-VERDUGIER. « Nano-chemical imaging of the dopaminergic cells ». Université de Bordeaux. Publications : 8. Communications : 13. Actuellement professeur de Biotechnologie à L'Académie de Poitiers.

-2015 (1 mois). Co-encadrement du séjour de formation du Dr M. El Bast, venu au laboratoire avec le programme international « Training Program IAEA Scientific Visitor » pour se former aux techniques d'analyse par faisceaux d'ions.

-2013 (1 mois). Co-encadrement du séjour de formation du Dr Joanna DUDALA, venue au laboratoire avec le programme international. « Training Program IAEA Scientific Visitor ». L'objectif de son stage était d'apprendre les logiciels GUPIX et SIMNRA utilisés pour le traitement de données des techniques PIXE et RBS (techniques de faisceau d'ions) pour la quantification des éléments dans des tissus fins biologiques.

5.2 Doctorant

-2016-2019. Co-encadrement du doctorat de Florelle DOMART. « Nano-imagerie corrélative de fluorescence X synchrotron et de super résolution des métaux et des protéines dans les synapses de neurones d'hippocampe ». Université de Bordeaux. Ecole doctorale des Sciences Chimiques. Publications : 4. Congrès : 4. Actuellement en post doc à l'Université de Göttingen.

-2010 Encadrement de Silvia GIL DURAN, doctorante de l'Université de Barcelone, lors de son séjour au laboratoire pour se former à la préparation des échantillons biologiques pour analyses par fluorescence de rayons X. En 2012 j'ai fait partie de son jury de thèse intitulé « New strategies in the treatment of radio resistant tumor cells by using synchrotron radiation and metallic compounds » soutenue à l'Université de Barcelone.

5.3 Stages de formation

-2022 (2 mois). Encadrement du stage L3 Physique Chimie de Isaac Robinson-Johnston. « Imagerie ultra-structurale et chimique des métaux dans les synapses neuronales : analyses par microscopie électronique ». Convention d'échanges entre l'Université de Bordeaux et Northern Arizona University.

-2016 (6 mois). J'ai participé à l'encadrement du stage M2 de Hao ZHOU. « Métallation des isoformes de point isoélectrique de la superoxyde dismutase 1 ». Université de Bordeaux- UTC Université de Technologie Compiègne.

-2015 (6 mois). Co-encadrement du stage M2 du Batiste L'HOMEL. « Imagerie chimique cellulaire : étude des mécanismes de toxicité des composés environnementaux du manganèse ». Université de Bordeaux. Publications :1.

-2012 (6 semaines). Co-encadrement du stage L2 d'Elise GILBERT. « Stress chimique cellulaire suite à l'exposition au cobalt insoluble ». Université de Bordeaux.

-2012 (4 semaines). Co-encadrement du stage de Matthias PORTELLANO comme assistant laboratoire. Université de Bordeaux-UTC Université de Technologie Compiègne. Il a travaillé sur le design d'un porte-échantillon spécifique à AIFIRA pour des échantillons biologiques de « grand taille ».

Pendant plusieurs années j'ai aussi accueillie des élèves de troisième qui venaient découvrir le laboratoire. Ils étaient accueillis dans le cadre d'un projet du laboratoire, nome START, dans lequel l'objectif était de résoudre une enquête après avoir rencontré et compris les activités des différentes équipes qui composent le laboratoire.

6. Communications

6.1 Conférences invitées dans des congrès internationaux

Frisbie Seth, Michell Erika, Ortega R, Roudeau S, **Carmona A.** « Excess Manganese in Infant Formula». International Virtual Seminar organized by the Universities of Norwich and Bordeaux, 23 February 2021.

Carmona A., Roudeau S., Pouzoulet F., Prezado Y., and Ortega R. Imaging the distribution of metallic compounds used for cancer treatment within tumors using micro-PIXE. 9th International symposium on BioPIXE. Iguazu Falls, Brazil, 7-12 January 2018.

6.2 Communications dans des congrès, séminaires et conférences

2022

Carmona A., Somogyi A., Roudeau S., Porcaro F., Medjoubi K., Vidaud C., Malard V., Bresson C., Ortega R. X-ray fluorescence imaging of uranium distribution in human dopaminergic cells. 15th International Conference on X-ray Microscopy, 19-24 June 2022 (poster, virtual).

Domart F., Cloetens P., Roudeau S., **Carmona A.**, Verdier E., Choquet D., Ortega R. Correlating STED and synchrotron XRF nano-imaging to explore metal functions in synapses. 15th International Conference on X-ray Microscopy, 19-24 June 2022 (conference, virtual).

Roudeau S., Trist B.G., **Carmona A.**, Davies K.M., Halliday G.M., Rufin Y., Claverol S., Van Malderen S.J.M., Falkenberg G., Double K.L., Ortega R. Coupling SEC and IEF to SXRF for the metallation analysis of SOD1 enzyme isolated from the human central nervous system. 15th International Conference on X-ray Microscopy, 19-24 June 2022 (poster, virtual).

Carmona A., Roudeau S., Ortega R. Synchrotron X-ray fluorescence nano-imaging as a tool to study the mechanisms of metal-induced synaptic neurotoxicity. 61st Annual Meeting Society of Toxicology, San Diego, USA, March 21-31, 2022 (poster - virtual).

2019

Carmona A., Zogzas C.E., Roudeau S., Porcaro F., Garrevoet J., Spiers K.M., Salomé M., Cloetens P., Mukhopadhyay S., Ortega R. SLC30A10 mutation involved in parkinsonism results in manganese accumulation in Golgi vesicles revealed by synchrotron XRF nano-imaging. ESRF User Meeting, Symposium: X-ray microscopy in biology: recent applications, challenges and opportunities. Grenoble, France, 4-6 February, 2019 (oral).

Carmona A., Zogzas C.E., Roudeau S., Porcaro F., Garrevoet J., Spiers K.M., Salomé M., Cloetens P., Mukhopadhyay S., Ortega R. SLC30A10 mutation involved in parkinsonism results in manganese accumulation within nano-vesicles of the Golgi apparatus revealed by synchrotron X-ray fluorescence imaging. 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology. Baltimore, Maryland, USA, 10-14 March 2019 (poster).

Carmona A., Zogzas C.E., Roudeau S., Porcaro F., Garrevoet J., Spiers K.M., Salomé M., Cloetens P., Mukhopadhyay S., Ortega R. SLC30A10 mutation involved in parkinsonism results in manganese accumulation within nano-vesicles of the Golgi apparatus revealed by synchrotron X-ray fluorescence imaging. Cell Biology of Metals Gordon Research Conference. Castelldefels, Spain, 14-19 July 2019 (poster).

Domart F., Cloetens P., **Carmona A.**, Roudeau S., Verdier E., Choquet D., Ortega R. Correlating Super Resolution Microscopy with Synchrotron X-ray Fluorescence Imaging to Study Metal Functions in Neuronal Synapses. Workshop: Quelques défis scientifiques à la lumière des synchrotrons de 4ème génération. Paris, France 16-17 September 2019 (poster).

Domart F., **Carmona A.**, Roudeau S., Porcaro F., Cloetens P., Choquet D., Ortega R. Development of nanoscopic correlative imaging (X-ray/photonic) to study the role of metals in the neuronal cytoskeleton. NeuroFrance, Marseille, France, 22-24 May 2019 (poster).

Domart F., **Carmona A.** Roudeau S., Porcaro F., Cloetens P., Choquet D., Ortega R. Nanoscopic Correlative Imaging (X-ray/photonic): A New Method to Study the Role of Metals in neuronal cytoskeleton and plasticity. Cell Biology of Metals Gordon Research Conference. Castelldefels, Spain, 14-19 July 2019 (poster).

Trist B., Cordwell S., Hare D., Blair I., Fifita J., Roudeau S., **Carmona A.**, Ortega R., Double K. SOD1 dysfunction and disease mechanisms in postmortem ALS tissue. 39th Annual Meeting of the Australasian Neuroscience Society. Adelaide, Australia, 2-5 December 2019 (oral).

Trist B., Cordwell S., Hare D., Fifita J., Roudeau S., Carmona A., Ortega R. and Double K. SOD1 dysfunction and disease mechanisms in postmortem ALS tissues. 30th International Symposium in Motor Neuron Disease. Perth, Australia, December 4-6 2019 (oral)

Bresson C., Paredes E., Malard V., Vidaud C., Ortega R., **Carmona A.**, Roudeau S., Porcaro F., Avazeri E., Robert M., Guigonis J.M. Investigation of uranium effects on neuron-like cells: an interdisciplinary analytical approach. European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry. Pau, France, 3-8 February 2019 (poster).

2018

Das S., Khatua K., **Carmona A.**, Porcaro F., Ortega R., Datta A. Sensing Manganese(II). 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference AsBIC. Singapur, 9-14 December, 2018 (oral).

Carmona A., Roudeau S., Porcaro F., Malard V., Vidaud C., Paredes E., Bresson C., Ortega R. Contribution of micro-PIXE imaging to understand the mechanisms of uranium neurotoxicity. 9th International Symposium on BioPIXE. Iguazu Falls, Brazil, 7-12 January 2018 (oral).

Porcaro F., **Carmona A.**, Roudeau S., Domart F., Somogyi A., Malard V., Vidaud C., Bresson C., Ortega R. Uranium distribution in human dopaminergic cells imaged by means of synchrotron XRF with 300 nm spatial resolution. 1ères Journées d'Etude de la Chimie sous Rayonnement et de la Radiochimie, Strasbourg, France, 27 May 1 Jun 2018 (oral).

2016

Carmona A., Roudeau S., Ortega R., Pouzoulet F., Prezado Y. Particle induced X-ray emission imaging of gadolinium distribution into xenograft U87 human glioblastoma after AGuIX nanoparticles injection. Microscopy and Microanalysis, Columbus, USA, 24-28 July 2016 (poster).

Trist B., Genoud S., Davies K.M., Smoothy V., Halliday G.M., Roudeau S., **Carmona A.**, Perrin-Verdugier L., Ortega R., Double K.L. A pathological link between Parkinson's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis? 20th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Berlin, Germany, 19-23 June, 2016 (poster).

Trist B., Genoud S., Davies K.M., Cottam V., Halliday G.M., Roudeau S., **Carmona A.**, Perrin-Verdugier L., Ortega R., Double K.L. A novel vulnerability specific pathology in the Parkinson's brain provides support for coinciding neuropathological paradigms. The Australian Biology of Aging Conference, Coogee, Australia, April 29 2016 (oral).

Roudeau S., Davies K., **Carmona A.**, Perrin-Verdugier L., Double K.L., Ortega R. Characterization of SOD1 pl isoforms in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease: net charge, metal content and number of isoforms. 6th International Conference on Metals in Genetics, Chemical Biology, and Therapeutics, Bangalore, India, 17-20 February 2016 (oral).

Davies K.M., Trist B., Cottam V., Hare D., Bohic S., **Carmona A.**, Ortega R., Double K. (2016) Copper and iron changes in Parkinson's disease brain; implications for aetiology and potential for novel treatments. 14th Meeting of The Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Kuala Lumpur, Malaysia, 27-30 August 2016 (oral).

Trist B., Genoud S., Davies K.M., Smoothy V., Halliday G., Roudeau S., **Carmona A.**, Perrin-Verdugier L., Ortega R., Double K. (2016) A novel vulnerability specific pathology in the Parkinson's brain; providing support for coinciding neuropathological paradigms, 39th annual meeting of the Japanese Neuroscience Society, Yokohama, Japan, 20-22 July, 2016 (poster).

2015

Carboni E., Lingor P., **Carmona A.**, Roudeau S., Barski E., Ortega R. Alpha-synuclein affects trace metal content in primary neuronal cultures. 45th Annual Meeting of Society for Neuroscience (SfN), Chicago, USA, 17-21 October 2015 (poster).

Trist B.G., Davies K.M., Cottam V., Halliday G.M., Roudeau S., **Carmona A.**, Perrin-Verdugier L., Ortega R., Double K.L. A novel proteinaceous aggregate associated with neuronal loss in Parkinson's disease. 25th Meeting of the International Society for Neurochemistry, Cairns, Australia, 23-27 August, 2015 (poster).

Trist B.G., Davies K.M., Cottam V., Halliday G.M., Roudeau S., **Carmona A.**, Perrin-Verdugier L., Ortega R., Double K.L. A novel proteinaceous aggregate associated with neuronal loss in Parkinson's disease. Dementia, Aging and Neurodegenerative Diseases ISN Satellite Meeting, Cairns, Australia, August 22, 2015 (oral).

2014

Carmona A., Roudeau S., Perrin L., Ortega R. Organelle fluorescence microscopy and synchrotron X-ray chemical element imaging in single cells. 12th International Conference on X-Ray Microscopy, Melbourne, Australia, 26-31 October 2014 (poster).

Ortega R., Roudeau S., Perrin L., Veronesi G., **Carmona A.** Environmental manganese compounds accumulate as Mn(II) within the Golgi apparatus of dopamine cells: relationship between speciation, subcellular distribution and cytotoxicity. 12th International Conference on X-Ray Microscopy, Melbourne, Australia, 26-31 October 2014 (poster).

Ortega R., **Carmona A.**, Roudeau S., Perrin L., Darolles C., Gautier C., Janin M., Flriani M., Aloin V., Bresson C., Malard V. Contribution of micro-PIXE to investigate the toxicology of particulate cobalt on human lung cells. 14th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications, Padova, Italy, 6-11 July 2014 (poster).

Ortega R., **Carmona A.**, Roudeau S., Perrin L., Darolles C., Gautier C., Janin M., Flriani M., Aloin V., Bresson C., Malard V. Contribution of micro-PIXE to investigate the toxicology of soluble and particulate cobalt on human lung cells. 8th International Symposium on BioPIXE, Bled, Slovenia, 14-19 September 2014 (orale).

Roudeau S., Davies K.M., **Carmona A.**, Perrin L., Double K.L., Ortega R. Coupling of isoelectric focusing with PIXE for the study of CuZnSOD in neurodegenerative diseases. 8th International Symposium on BioPIXE, Bled, Slovenia, 14-19 September 2014 (oral).

Carboni E., Roudeau S., Barski L., Tatenhorst L., Bähr M., **Carmona A.**, Ortega R., Lingor P. Influence of α -synuclein on intracellular levels of transition metals. 9th FENS Forum of Neuroscience, Milan, Italy, 5-9 July 2014 (poster).

2013

Carmona A., Ortega R. Iron storage within dopamine vesicles revealed by synchrotron radiation X-ray fluorescence nano-imaging. 4th European Synapse Meeting, Bordeaux, France, 28-30 August 2013 (poster).

Carmona A., Perrin-Verdugier L., Carcenac C., Roudeau S., Bohic S., Carrez D., Wu T.D., Marco S., Guerquin-Kern J.L., Savasta M., Ortega R. Iron distribution in 6-OHDA animal and cellular models of Parkinson's disease using high spatial resolution PIXE, SXRF and SIMS. 13th International Conference on Particle Induced X-ray Emission, Gramado, Brazil, 3-8 March 2013 (oral).

Matsuyama S., Ishii K., Terakawa A., Kikuchi Y., Fujiwara M., Sugai H., Karahashi M., Nozawa Y., Yamauchi S., Watanabe K., Fujisawa M., Ishiya M., Nagaya T., Ortega R., **Carmona A.**, Roudeau S. Improvement of the Tohoku microbeam system for nanoscopic analysis. 13th International Conference on Particle Induced X-ray Emission, Gramado, Brazil, 3-8 March 2013 (poster).

Bresson C., Darolles C., **Carmona A.**, Gautier C., Sage N., Roudeau S., Ortega R., Ansoborlo E., Malard V. Cobalt chloride speciation, mechanisms of cytotoxicity on human pulmonary cells, and synergistic toxicity with zinc. 49th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Interlaken, Suisse, 1-4 September 2013 (poster).

Bresson C., Darolles C., **Carmona A.**, Gautier C., Sage N., Roudeau S., Ortega R., Ansoborlo E., Malard V. Speciation and toxicity of cobalt on human lung cells : an interdisciplinary study. XXXVIII Colloquium Spectroscopicum Internationale, Tromsø, Norway, 16-20 June 2013 (oral).

Ortega R., Roudeau S., **Carmona A.** Methods for micro-chemical imaging of inorganic elements in speleothems from the Human Cradle in South Africa and from other origins. Biennial Conference of Association of Southern African Professional Archaeologists (ASAPA), Gaborone, Botswana, 3-7 July 2013 (poster).

2012

Ortega R., **Carmona A.**, Roudeau S., Bresson C., Darolles C., Gautier C., Ansoborlo E., Malard V. Imagerie chimique par microfaisceau d'ions pour l'étude de la toxicologie nucléaire du cobalt. XIIIèmes Journées Nationales de Radiochimie et de Chimie Nucléaire, Nantes, France, 4-5 Octobre 2012 (oral).

Bresson C., Darolle C., **Carmona A.**, Gautier C., Roudeau S., Ortega R., Ansoborlo E., Malard V. Cobalt chloride toxicity, speciation, subcellular distribution and impact on Zn-homeostasis on human pulmonary epithelial cells. 5th International meeting dedicated to Metals Homeostasis (IMBG), Autrans, France, 19-21 September 2012 (poster).

2011

Carmona A., Perrin-Verdugier L., Roudeau S., Devès G., Bohic S., Carrez D., Wu T.D., Marco S., Guerquin-Kern J.L., Ortega R. Trace element distribution in dopaminergic cells using micro-PIXE and other high spatial resolution element imaging techniques. 7th International Symposium on BioPIXE, Sendai, Japan, 30 October - 4 November 2011 (poster).

2010

Barberet Ph., Daudin L., Sorieul S., Simon M., Sez nec H., Devès G., Ortega R., **Carmona A.**, Roudeau S., Incerti S., Habchi C., Delalée F., Serani L., Moretto Ph. First results obtained with the CENBG nanobeam line : performances and applications. 12th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications. Leipzig, Germany, 26-30 July 2010 (oral).

Ceccone G., Marmorato P., Ponti J., Rossi F., Kaulich B., Gianoncelli A., Kiskinova M., Salomé M., Ortega R., Devès G., **Carmona A.**, Pascolo L. Synchrotron radiation X-ray fluorescence mapping of cobalt ferrite nanoparticles in BALB 3T3 fibroblast cells. AVS 57th International Symposium & Exhibition, Albuquerque, USA, 17-22 October 2010 (oral).

Carmona A. Spéciation et imagerie des métaux à l'échelle subcellulaire par microsondes de rayonnement X. Séminaire de Toxicologie Nucléaire Environnementale et humaine. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France, 26 Décembre 2010 (oral).

Ortega R., Devès G., Roudeau S., **Carmona A.** Application des techniques d'analyse par faisceau d'ions pour l'imagerie chimique cellulaire. 3ème rencontres Francophones sur les techniques d'analyse par faisceaux d'ions rapides, Namur, Belgique, 15-18 Novembre, 2010 (oral).

2009

Bohic S., **Carmona A.**, Ortega R., Reyes S., Carew-Jones F., Double K. Metallomics of neuromelanin in Parkinsonian syndromes. 29th Meeting of the Australian Neuroscience Society, Canberra, Australia, 27-30 January 2009 (oral).

2008

Carmona A., Devès G., Ortega R. Nuclear microprobe quantification of manganese in PC12 dopaminergic cells. 11th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications, Debrecen, Hungary, 20-25 July 2008 (poster).

Devès G., **Carmona A.**, Ortega R. Imagerie et quantification des éléments chimiques cellulaires par combinaison des techniques d'analyse par faisceaux d'ions STIM, μ -RBS et μ -PIXE. 2ème Rencontres Analyse par Faisceaux d'Ions Rapides, Carcans, France, 13-15 Octobre, 2008 (oral)

Matsuyama S., Ishii K., Yamazaki H., Kikuchi Y., Terakawa A., Fujiwara M., Kawamura Y., Tsuboi S., Watanabe M., Deves G., **Carmona A.**, Ortega R. 3D imaging of carcinogenic chromium compounds in human lung cells, SAKURA project. 25th Symposium on PIXE, Maebashi, Japan, 10-12 September 2008 (oral).

Chevreux S., Roudeau S., Fraysse A., **Carmona A.**, Devès G., Solari P.L., Weng T.S., Mounicou S., Lobinski R., Ortega R. Direct analysis and speciation of metals in copper-zinc superoxide dismutase isoforms separated on electrophoresis gels. 4th International Conference on Metals and Genetics, Paris, France, 21-24 July, 2008 (oral).

Carmona A., Devès G., Cloetens P., Bohic S., Ortega R. Manganese distribution into dopaminergic cells using synchrotron radiation X-ray fluorescence nano-chemical imaging. 4th International Conference on Metals and Genetics, Paris, France, 21-24 July, 2008 (poster).

Bacquart T., Devès G., **Carmona A.**, Ortega R. Direct speciation analysis of arsenic in subcellular compartments using micro-X-ray absorption spectroscopy. 2nd International Congress on Arsenic in the Environment, Valencia, Spain, 21-23 May 2008 (oral).

2007

Carmona A., Cloetens P., Devès G., Bohic S., Ortega R. Nano-imaging of iron X-ray fluorescence into dopaminergic single cells. 1st International Symposium on Metallomics, Nagoya, Japan, 28 november – 1st December 2007 (poster).

Ortega R., **Carmona A.**, Devès G., Matsuyama S., Ishii K. Imaging of chromium carcinogenic compounds using ion beam analysis. The 8th international conference on surface and interface analysis by ion beams, Sendai, Japan, 7-8 December 2007 (oral).

Ortega R., Fraysse A., Chevreux S., Roudeau S., Devès G., **Carmona A.**, Solari P.-L., Mounicou S., Lobinski R. Direct metal analysis of CuZnSOD on isoelectrofocusing gels using ion beam analysis, LA-ICP-MS, and X-ray absorption spectroscopy. Spectrométrie de masse et analyse protéomique (SMAP), Pau, France, 17-20 September 2007 (oral).

2005

Wierzchos J., Ascaso C., Ager F.J., García I., **Carmona A.**, Respaldiza M.A. Identifying elements in rocks from the Dry Valleys desert (Antarctica) by ion beam proton induced X-ray emission. 17th International Conference on Ion Beam Analysis, Seville, Spain, 26 June - 1st July 2005 (poster).

2004

Ortega R., Biston M.C., Devès G., Bohic S., **Carmona A.** Nuclear microprobe determination of platinum quantitative distribution in rat brain tumor after cisplatin or carboplatin injection for PAT treatment of glioma, 9th International Conference Nuclear Microprobe Technology and Applications, Dubrovnik, Croatia, 13-17 September 2004 (poster).

2003

Carmona A., Ynsa M.D., Ortega R., Respaldiza M.A., Ager F.J. Aplicaciones de Carácter Biológico en el Centro Nacional de Aceleradores. XXIX Reunión Bienal de Física y Química, Madrid, Spain, 13-17 June 2003 (oral).

Respaldiza M.A., Ferrer F.J., Ager F.J., **Carmona A.**, Ferrero, A. García-López J., García-Orellana I., Gómez-Tubío B., Morilla Y., Ontalba M.A., Ynsa M.D. Caracterización no destructiva de materiales mediante técnicas de análisis basadas en haces de iones. X Congreso Nacional de Ensayos no Destructivos, Cartagena, Spain, June, 2003 (oral).

7. Collaborations scientifiques

7.1 Internationales

Professeur Kay DOUBLE. Neuroscience Research (NeuRA), Université de Sydney, Australie. « Copper pathology in Parkinson's disease ».

Dr Erin MCALLUM. The Florey Institute of Neuroscience, Université de Melbourne, Australie. « Metals and protein aggregation in neurodegenerative disease ».

Dr Somshuvra MUKHOPADHYAY. Institute for Cellular and Molecular Biology and Institute for Neuroscience, Université de Texas, Austin, United States. « Imagerie cellulaire du manganèse et parkinsonisme ».

Dr Seth FRISBIE. Department of Chemistry and Biochemistry, Université de Norwich, Northfield, USA. « Manganese intakes in infant formula milk ».

Dr Byron JONES. Biobehavioral Health and Pharmacology, Université de Pennsylvanie, Pennsylvanie, USA. « Iron imaging in substantia nigra from mice ».

Dr Paul LINGOR. Department of Neurology, Université de Médecine, Göttingen, Allemagne. « Chemical speciation, imaging and quantification of metals in alpha-synuclein cellular models of Parkinson's disease ».

Dr Ankona DATTA. Tata Institute of Fundamental Research, Mumbai, Inde. « Manganese imaging in cells ».

Dr Keizo ISHII. Department of Quantum Science and Engineering, Université de Tohoku, Sendai, Japon. « Computed tomography 3D imaging of carcinogenic chromium compounds in human lung cells ».

7.2 Nationales

Dr Daniel CHOQUET. Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (IINS), Université de Bordeaux – CNRS.

Dr Véronique MALARD. Institute of Biosciences and Biotechnologies of Aix Marseille (BIAM), CEA – Université Aix Marseille – CNRS. « Programme de Toxicologie Nucléaire : Spéciation du Cobalt ».

Dr Carole BRESSON. Service d'Etudes Analytiques et de Réactivité des Surfaces (SEARS), CEA – Université Paris-Saclay. « Programme de Toxicologie Nucléaire : Spéciation du Cobalt ».

Dr Yolanda PREZADO. Imagerie et Modélisation en Neurobiologie et Cancérologie (IMNC). Université de Paris 7 et 11 – CNRS.

Dr Catherine LEBLANC. Laboratoire de Biologie Intégrative des Modèles Marins. Station Biologique de Roscoff. Sorbonne Université – CNRS.

Dr Marc SAVASTA. Institute de Neuroscience de Grenoble (GIN), Université de Grenoble Alpes – INSERM, Grenoble. « ANR PIRIBio Nano-chemical imaging of the dopaminergic cell ».

Dr Jean-Luc GUERQUIN-KERN. Chemistry, Modeling and Imaging for Biology (CMIB), Institute Curie – Université Paris Sud – INSERM. « ANR PIRIBio Nano-chemical imaging of the dopaminergic cell ».

Dr Sylvain BOHIC. Institut de Neurosciences de Grenoble (GIN), Université de Grenoble Alpes – INSERM, Grenoble. « ANR PIRIBio Nano-chemical imaging of the dopaminergic cell ».

Dr Peter CLOETENS. ID16A Nano-Imaging Beamline, ESRF, Grenoble, France. « Développement de méthodes de microspectroscopie par rayonnement synchrotron ».

8. Participation à programmes de recherche

8.1 Principaux programmes de recherche auxquels j'ai participé

CNRS MITI-Osez l'interdisciplinarité (2018-2020): "Imagerie corrélative de super résolution (40 nm) des protéines et des métaux synaptiques". Collaborations: Institut Interdisciplinaire de Neurosciences et synchrotron européen ESRF.

PEPS CNRS-IDEX Bordeaux (2018-2020): "Imagerie corrélative de super résolution (40 nm) des protéines et des métaux synaptiques". Collaborations: Institut Interdisciplinaire de Neurosciences et synchrotron européen ESRF.

PEPS CNRS-IDEX Bordeaux (2016-2017): Développement de l'imagerie chimique nanoscopique corrélative (rayonnement X / photonique) pour l'étude du rôle des métaux dans la plasticité synaptique (CorXsyn) ". Collaborations: Institut Interdisciplinaire de Neurosciences et synchrotron européen ESRF.

PEPS CNRS FaiDoRA (2016-2017) : « Seuils et mécanismes cellulaires de neurotoxicité de l'uranium naturel à faibles doses ». Collaborations: CEA Saclay et Marcoule.

Programme de Toxicologie Nucléaire (2014-2017): « Uranium à faibles concentrations dans des cellules NEURonales humaines en culture : Cibles biologiques, Imagerie et Spéciation ». Collaborations: CEA Saclay et Marcoule.

NEEDS-Environment (2013-2015) : "Chemical speciation and distribution of stable and radioactive iodine in marine algal kelps" CNRS, Végétaux marins et biomolécules, Roscoff, France

ANR Blanc Subcelif (2012-2016): "Distribution intra-cellulaire du fer chez les plantes, spéciation chimique et nouvelles fonctions" Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes, INRA, Montpellier, France.

Partenariats Hubert Curien (2011-2012): "Chemical speciation, imaging and quantification of metals in alpha-synuclein cellular models of Parkinson's disease". University of Medicine of Göttingen, Allemagne.

Partenariats Hubert Curien (2011-2012): "Micro-computed tomography 3D imaging of carcinogenic compounds in human lung cells". Tohoku University, Sendai, Japon.

ANR PIRIBio (2010-2012): "Nano-chemical imaging of the dopaminergic cell" Institut Curie, Grenoble Institute of Neurosciences, France.

Programme de Toxicologie Nucléaire (2010-2011): " Toxicité et accumulation intracellulaire du cobalt soluble et particulaire dans des cellules pulmonaires humaines en culture". Collaborations: CEA Saclay et Marcoule.

Integrated Infrastructure Initiative (I3) funded by the European Commission (2009-2010): “Mapping of cobalt ferrite nanoparticles in BALB 3T3 fibroblast cells”. Collaboration: Institute for Health and Consumer Protection, Italy.

Partenariats Hubert Curien (2009-2010): “Computed tomography 3D imaging of carcinogenic chromium compounds in human lung cells”. Collaborations Tohoku University, Japon.

9. Autres responsabilités

-Depuis Mai 2022: Editeur Associé dans Brain Imaging Methods, une section special des revues Frontiers in Neuroscience, Frontiers in Neurology and Frontiers in Neuroimaging.

-Depuis Janvier 2022 : membre du commitee du programme de temps de faisceau, pannel 5 ‘Biologie, santé’, à SOLEIL, Paris, France.

-Depuis Septembre 2021 : membre du commitee du programme de temps de faisceau, beamlines P05 and P06, à DESY, Hambourg, Allemagne.

-Entre 2020-2021 j’ai été éditeur invité pour la coordination d’un numéro spécial dans la revue Toxics, intitulé « Neurotoxicity of Environmental Metal Toxicants ».

-De 2018-2020 membre du Conseil de Laboratoire du CENBG.

-De 2011 et jusqu’au fin 2015 j’étais membre de la commission d’hygiène et sécurité de mon laboratoire.

-Révisseuse dans des revues scientifiques comme : Journal of The Royal Society Interface, Journal of Environmental and Occupational Science, Journal of Clinical Toxicology, International Journal of Nanomedicine, Langmuir, Metallomics, Nuclear Instruments and Methods.

-Membre du comité organisateur de « 17th International Conference on Ion Beam Analysis » tenue du 26 Juin au 1 Juillet 2005 à Séville.

Partie B. Bilan des activités de recherche

1. Introduction

Mes activités de recherche sont liées au développement et à l'application de techniques de chimie analytique, fondées sur l'utilisation d'accélérateurs de particules, pour comprendre la toxicologie et/ou élucider le rôle des métaux (Mn, Fe, Cu, Zn, Co, U...) et leurs protéines associées dans des maladies neurodégénératives. À cette fin, j'ai utilisé des techniques de spectroscopie d'analyse par faisceau d'ions ou rayonnement synchrotron pour la détermination des métaux (imagerie, quantification et spéciation), tels que PIXE (*Particle Induced X-Ray Emission*), SXRF (*Synchrotron X-Ray Fluorescence*), XANES (*X-Ray Absorption Near Edge Structure*) et des techniques de microscopie de fluorescence : épifluorescence, confocale, STED (*STimulated Emission Depletion*) pour l'analyse des protéines.

La connaissance de la répartition des éléments chimiques dans les organites cellulaires peut révéler leur fonction dans une variété de processus cellulaires. Voici quelques-unes des questions fondamentales que nous abordons : Quelle est la répartition des métaux traces dans les cellules ? Certains éléments s'accumulent-ils dans les organites sub-cellulaires de manière spécifique ? Quelles sont les espèces chimiques des éléments présents dans ces organites ? Pour localiser précisément la répartition des éléments, il faut identifier les organites cellulaires ; cela peut être réalisé en marquant les protéines d'intérêt avec des fluorochromes. Le but étant de corréler la distribution des protéines et des métaux, j'ai développé et adapté les méthodes de préparation des échantillons pour permettre la compatibilité de ces techniques tout en préservant l'état natif des échantillons.

Pour étudier les métaux, nous utilisons des accélérateurs des particules, notamment la plateforme AIFIRA (Applications interdisciplinaires des faisceaux d'ions en région Aquitaine) et les techniques PIXE (*Particle Induced X-Ray Emission*) et RBS (*Rutherford Backscattering Spectroscopy*) pour quantifier les éléments chimiques dans les échantillons biologiques. Cet instrument est d'une grande utilité pour l'analyse des tissus et la quantification d'un grand nombre des cellules. Mais si on souhaite étudier les métaux à l'intérieur des cellules, la résolution spatiale n'est pas suffisante. Nous avons donc aussi eu recours à des plus grandes installations avec des accélérateurs de type synchrotron, ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*, Grenoble), SOLEIL (Source optimisée de lumière d'énergie intermédiaire du LURE, Saint-Aubin), DESY (*Deutsches Elektronen-Synchrotron*, Hambourg) et APS (*Advanced Photon Source*, Chicago) et fait usage des techniques SXRF (*Synchrotron X-ray Fluorescence*) et XANES (*X-ray Absorption Near Edge Structure*). La première de ces techniques nous permet de déterminer la distribution de la composition élémentaire dans nos échantillons et la seconde de déterminer l'état d'oxydation des éléments puisque la réactivité et la toxicité de métaux dépendent, entre autres paramètres, de son état redox. Dans ces lignes de lumière, la résolution spatiale est en dessous de 1 μm , pouvant aller actuellement jusqu'à 10 à 30 nm. Également l'intensité de faisceau est un paramètre très important puisque nous étudions des éléments chimiques présents à l'état de trace, voire ultratrace, dans les échantillons.

Ces techniques d'imagerie spectroscopique sont d'une grande utilité pour déterminer la distribution et la quantification des métaux, mais pour comprendre leurs mécanismes de toxicité nous avons besoin de déterminer les protéines auprès desquelles ils interviennent. Ainsi, tout au long de mes recherches, nous avons développé une microscopie corrélative métaux-protéines. Nous avons utilisé les microscopies

d'épifluorescence, confocales ou STED en fonction de la résolution spatiale nécessaire, couplées avec les techniques PIXE, SXRF ou XANES. L'imagerie des métaux nécessite des méthodes cryogéniques pour la préparation des échantillons afin de préserver leur concentration et distribution native dans les tissus biologiques, donc nous avons aussi adapté les techniques de microscopie de fluorescence en fonction de la préparation d'échantillon. Cette méthodologie corrélative était décomposée en trois étapes : premièrement le marquage *in vivo* des protéines d'intérêt, grâce à l'utilisation de protéines fluorescentes ; deuxièmement la cryopréparation et lyophilisation des échantillons et, en dernière étape, l'analyse des métaux dans les mêmes échantillons et pour les mêmes zones observées en fluorescence.

En utilisant ces techniques analytiques, nous nous sommes intéressés à différents sujets de recherche. Par exemple nous avons étudié l'implication du Mn et du Fe dans la maladie du Parkinson (en anglais *Parkinson disease PD*) et leur interaction avec différentes biomolécules, protéines ou neurotransmetteur: α -synucléine, dopamine et SLC30A10. De même, nous nous sommes intéressés au possible rôle du Cu et du Zn dans la plasticité synaptique et leur interaction avec l'actine et la tubuline. Nous avons étudié la solubilité des microparticules du Co et la neurotoxicité de l'uranium, deux éléments auxquels les professionnels travaillant dans les centrales nucléaires peuvent être exposés. Grâce à ces techniques, j'ai pu aussi prêter main-forte dans d'autres domaines, comme l'étude de l'accumulation d'iode dans l'algue brune *Laminaria digitata*, la détermination de la distribution élémentaire des macrofossiles et j'ai mis en valeur l'utilisation de ces techniques dans l'étude de l'incorporation des composés métalliques antitumoraux dans les tumeurs dans le but d'une utilisation en radiothérapie ou en chimiothérapie.

2. Analyse par faisceau d'ions

Les techniques de spectrométrie par faisceau d'ions sont fondées sur la mesure du rayonnement émis lorsqu'une particule chargée et accélérée interagit avec un échantillon. Concrètement, nous avons utilisé un faisceau de protons accélérés à 3 MeV, la ligne de faisceau dite « de haute résolution spatiale » de la plateforme AIFIRA du CENBG (Centre d'études nucléaires de Bordeaux Gradignan, aujourd'hui LP2iB Laboratoire de Physique des 2 infinis de Bordeaux) et nous avons mis en œuvre les techniques PIXE et RBS.

2.1 La plateforme AIFIRA et la ligne de haute résolution spatiale

AIFIRA est un accélérateur électrostatique simple étage de 3,5 MV de type Singletron de la société HVEE (<https://www.lp2ib.in2p3.fr/aifira/>). Ce type d'accélérateur fournit une haute brillance du faisceau et stabilité énergétique, pouvant accélérer des protons, deutérons et particules *alpha*. À la sortie du tank d'accélération, le faisceau trouve un profileur, une cage de Faraday et des fentes d'ouverture et de direction pour le transporter vers l'aimant d'analyse à 90°. L'intensité appliquée à cet aimant va nous permettre de sélectionner les particules d'intérêt et leur énergie. Après l'aimant d'analyse, le faisceau passe par des fentes de régulation, qui assurent la stabilité énergétique, et par un deuxième profileur de suivi de trajectoire. Après quoi le faisceau est dirigé vers la « chambre objet » utilisée pour la définition de la taille du faisceau et l'ajustement de la trajectoire. Enfin, le faisceau passe par l'aimant de commutation qui dévie les ions vers la ligne de faisceau sélectionnée (figure 2B.1). Dans le cas d'une utilisation de la ligne de haute résolution spatiale, le faisceau n'est pas dévié et continue sur une trajectoire rectiligne (ligne à 0°).

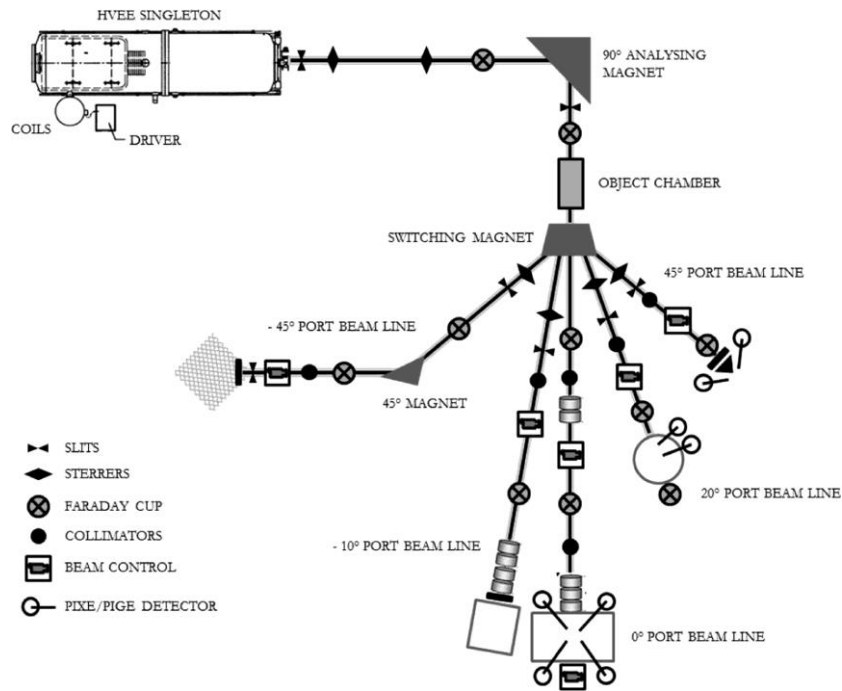


Figure 2B.1 Vue schématique de l'installation AIFIRA au CENBG (Sorieu 2014).

Nos analyses sont menées sur la ligne de microfaisceau à haute résolution (figure 2B.2). Le système de focalisation est fondé sur l'utilisation de deux séries de quadrupôles électromagnétiques (Barberet 2009) qui peuvent fournir une résolution spatiale d'environ $1 \mu\text{m}$ avec une intensité de centaines de pA. La chambre d'analyse est équipée de deux détecteurs de rayons X Si(Li) de 80 mm^2 placés à $\pm 45^\circ$ pour la technique PIXE et d'un détecteur à barrière de surface annulaire ORTEC (surface de 150 mm^2 , profondeur d'appauvrissement égale à $1\,000 \mu\text{m}$) disponible pour RBS. Cette ligne est équipée d'un système de balayage et d'imagerie du microfaisceau qui permet : d'un côté de réduire les dommages causés par les radiations dans l'échantillon et de l'autre de produire des cartes élémentaires avec une résolution de 256×256 pixels. Le système de balayage électrostatique est basé sur un double ensemble de plaques parallèles utilisées pour dévier le faisceau dans les directions verticale et horizontale de façon contrôlée et en enregistrant les spectres PIXE/RBS pour chaque position.



Figure 2B.2. Vue de la ligne de haute résolution spatiale de l'installation AIFIRA au CENBG (Barberet 2009).

2.2 Techniques PIXE et RBS

Nous avons fait usage de la technique PIXE, plus concrètement micro-PIXE, puisque nous utilisons un faisceau d'ions incident d'une résolution spatiale de l'ordre du micron. Cette technique est fondée sur le principe d'interaction des ions d'un faisceau incident avec les électrons qui composent l'échantillon (Johansson 1976). Quand une particule chargée accélérée incidente interagit avec un électron situé sur les couches internes d'un atome qui constitue l'échantillon, alors cet électron peut être éjecté de sa couche. Immédiatement une réorganisation électronique a lieu et un électron d'une couche plus externe vient combler la lacune. La différence d'énergie entre les deux couches électroniques peut être libérée sous forme de rayonnement X, d'énergie $E_1 = E_K - E_L$ ou $E_2 = E_L - E_M$ (figure 2B.3).

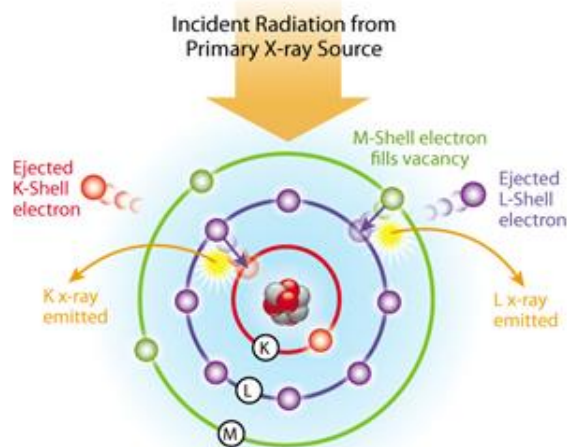


Figure 2B.3. Schéma de production des raies-X d'émission K et L. Le faisceau incident peut être sous forme de particules chargées accélérées (méthode d'analyse PIXE) ou de rayonnement X (méthode d'analyse XRF).

La technique PIXE consiste à mesurer l'énergie des photons X émis par l'échantillon. L'énergie de liaison (E_K , E_L) d'un électron engagé dans une couche interne (n) d'un atome est caractéristique de l'élément considéré (Z). Donc, l'énergie des photons émis (E_1 , E_2) est caractéristique du numéro atomique Z de l'élément excité et des transitions électroniques impliquées (K, L, M). En mesurant cette énergie émise il est possible d'identifier les éléments constitutifs de la cible irradiée, notre échantillon d'intérêt. Les énergies des raies X émises sont connues et répertoriées pour chaque élément en fonction de la couche électronique ionisée et de la transition X impliquée. La transition électronique de la couche électronique L vers la couche K est appelée $K\alpha$, la transition de la couche M vers la couche K, $K\beta$, de la couche M vers la couche L, $L\alpha$, et ainsi de suite. La technique PIXE permet une analyse multi-élémentaire et la détection de rayons X émis se fait au moyen de détecteurs X à dispersion d'énergie, dans notre cas nous utilisons des détecteurs au silicium dopés au lithium qui permettent de détecter tous les éléments à partir du sodium ($Z \geq 11$), soit par l'intermédiaire de leurs raies K, soit de leurs raies L (figure 2B.4).

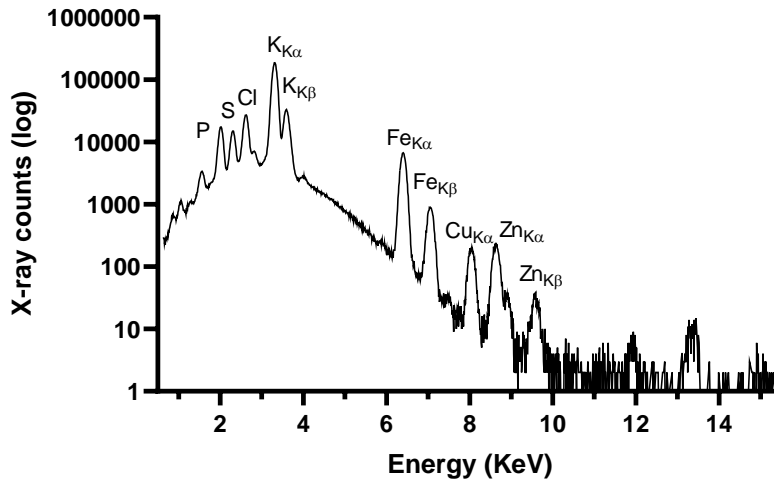


Figure 2B.4. Spectre PIXE représentatif des échantillons biologiques montrant les principaux éléments chimiques détectés.

En pratique, la sensibilité de détection dépend fortement de la matrice constituant l'échantillon. Dans le cas des échantillons biologiques et fins la composante du bruit de fond dans le spectre est faible et du fait de la taille réduite du faisceau, la limite absolue de détection peut être abaissée jusqu'à $10^{-16} - 10^{-19}$ g. L'analyse PIXE par microsonde nucléaire s'avère particulièrement utile pour la détermination multi-élémentaire quantitative d'éléments endogènes (métaux essentiels, Mn, Fe, Cu, Zn) ou exogènes (composés pharmacologiques, métaux toxiques...) dans des échantillons organiques.

L'analyse quantitative nécessite la calibration de certains paramètres du système de détection à partir de matériaux standards de référence. La formule de base utilisée pour déterminer le nombre d'atomes par unité de surface (A) d'un élément présent dans un échantillon fin peut être simplifiée et calculée à partir de la surface du pic correspondant sur le spectre X (N_x), selon la formule ci-dessous. Certains paramètres dépendent du système d'acquisition, c'est pourquoi il faut le calibrer ($\Delta\Omega$, T , ε), d'autres sont connus et répertoriés (σ_p) et d'autres sont à déterminer expérimentalement directement à partir du spectre PIXE (N_x) ou grâce à la technique RBS (n_p).

$$N_x = A n_p \sigma_p \frac{\Delta\Omega}{4\pi} T \varepsilon$$

Avec A : nombre d'atomes ou grammes de l'élément recherché par unité de surface ; N_x : nombre d'événements enregistrés (surface du pic) ; n_p : nombre de particules ayant interagi avec la cible ; σ_p : section efficace de production de la raie X considérée ; $\Delta\Omega$: angle solide de détection ; T : facteur de transmission à travers le filtre du détecteur ; ε : efficacité du détecteur pour la raie X considérée. En pratique la quantification est faite avec le logiciel GupixWin (Campbell 2010). Il répertorie les sections efficaces de production de rayons X pour chaque élément en fonction des caractéristiques des particules incidentes. Et il est capable de calculer d'autres paramètres, comme le facteur de transmission et l'efficacité du détecteur, en fonction des données expérimentales que nous introduisons.

La spectrométrie de rétrodiffusion des particules incidentes (RBS) est complémentaire et se réalise simultanément à l'analyse PIXE. Elle nous permet de déterminer les éléments légers, principaux constituants des échantillons biologiques, comme le carbone, l'azote et l'oxygène, ainsi que l'épaisseur (g/cm^2) de cette matrice organique. D'un autre côté, la technique RBS nous permet de déterminer le nombre de particules qui ont interagi avec la cible (n_p), un paramètre nécessaire pour la quantification par PIXE. Le couplage de deux techniques nous permet d'exprimer les concentrations surfaciques des éléments obtenus par PIXE (g/cm^2) en concentrations massiques ($\mu\text{g}/\text{g}$) (Carmona 2008 a).

Le principe est fondé sur la diffusion nucléaire élastique, ou diffusion Rutherford, l'interaction nucléaire prédominante pour des particules de basse énergie ($< 3 \text{ MeV}$). Lors de la collision entre une particule incidente et le noyau d'un atome cible, l'interaction coulombienne élastique se caractérise par la conservation de l'impulsion totale et de l'énergie cinétique totale du système (Chu 1978). Lorsqu'un projectile de masse M_1 ayant une énergie E_0 interagit avec un noyau cible de masse M_2 , il est diffusé selon un angle θ avec une énergie E_1 (figure 2B.5). Cette énergie de diffusion E_1 peut se relier à l'énergie de la particule incidente (E_0) par la formule $E_1 = K E_0$. Où K est un facteur cinématique défini par les masses de deux particules mises en œuvre et l'angle de diffusion.

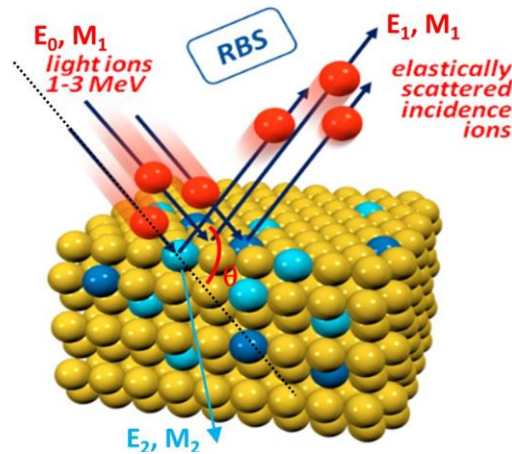


Figure 2B.5. Schéma de principe de diffusion de type Rutherford d'une particule légère (M_1) avec les atomes (M_2) d'un échantillon.

$$K = \left(\frac{M_1 \cos \theta + \sqrt{M_2^2 - M_1^2 \sin^2 \theta}}{M_1 + M_2} \right)^2$$

Si le détecteur de particules est placé devant l'échantillon ($\theta > 90^\circ$), la technique d'analyse mise en œuvre est appelée spectrométrie par rétrodiffusion de Rutherford ou RBS. L'identification de la masse de l'atome cible M_2 s'obtient à partir de la mesure de E_1 , pour un angle de rétrodiffusion donné θ , en connaissant E_0 et M_1 (énergie et masse des particules du faisceau incident). Cette technique multi-élémentaire nous permet une analyse quantitative. Il est possible de remonter au nombre de noyaux de l'élément recherché (A) d'après la formule suivante :

$$N_{RBS} = A n_p \frac{d\sigma}{d\Omega} \Delta\Omega$$

Avec N_{RBS} : nombre de particules rétrodiffusées détectées ; A : nombre de noyaux de l'élément recherché par unité de surface ; n_p : nombre de particules incidentes ; $d\sigma/d\Omega$: section efficace différentielle de diffusion Rutherford (b/sr) ; $\Delta\Omega$: angle solide de détection (sr). Certains paramètres sont à déterminer à partir du spectre RBS (N_{RBS} , n_p), d'autres sont mesurés après calibration du système ($\Delta\Omega$) et d'autres sont répertoriés pour chaque élément suivant la nature et l'énergie des particules incidentes et l'angle de détection ($d\sigma/d\Omega$).

Dans un spectre RBS, l'aire du pic est proportionnelle à la concentration de l'élément dans la cible. Mais sa forme constitue également une source d'information (figure 2B.6). Le ralentissement des particules dans la matière se traduit par une perte d'énergie proportionnelle à l'épaisseur traversée. Donc la largeur du spectre RBS varie en fonction de la perte d'énergie du projectile lorsqu'il traverse la matrice. C'est-à-dire que la largeur du spectre dépend donc de l'épaisseur de la cible. Ainsi, la mesure de la perte d'énergie permet de connaître l'épaisseur de l'échantillon analysé par la formule suivante :

$$\Delta E = E - E_0 = \int_0^{x_e} \frac{dE}{dx} | E(x) dx$$

Avec E_0 : énergie des particules incidentes (KeV) ; E : énergie des particules ayant traversé une épaisseur x_e de matériau (KeV) ; dE/dx : pouvoir d'arrêt du matériau à l'énergie $E(x)$ (KeV/ μ m). Le pouvoir d'arrêt d'une cible constituée d'éléments différents (*i.e.* matrice organique $C_xH_yO_z$) peut être calculé (loi de Bragg) à partir des pouvoirs d'arrêt atomiques. Eux-mêmes sont répertoriés pour chaque élément cible en fonction de l'énergie des projectiles. Tous ces paramètres sont tabulés ou calculés avec le logiciel Simnra (Mayer 1997).

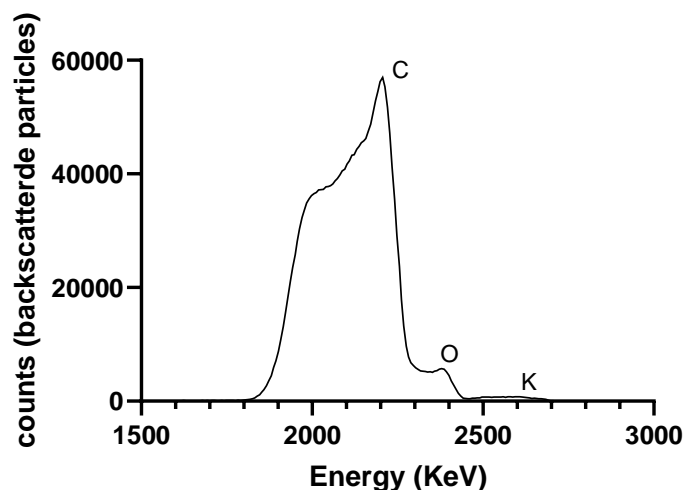


Figure 2B.6. Spectre RBS représentatif des échantillons biologiques, la largeur des pics est proportionnelle à l'épaisseur de l'échantillon.

La combinaison de ces deux techniques PIXE et RBS à l'échelle micrométrique est d'une grande utilité pour l'analyse des tissus biologiques et la quantification d'un grand nombre des cellules. Elles nous permettent de mettre en évidence des localisations élémentaires et de les quantifier. Pour illustrer le potentiel de ces techniques dans des applications biologiques, je vais présenter ci-après deux projets de recherche auxquels j'ai participé notamment pour la mise en œuvre des conditions expérimentales de préparation des échantillons, de leur analyse par faisceau d'ions et pour le traitement des données: le premier sur l'étude de la toxicologie du cobalt dans des modèles cellulaires humains et le deuxième sur la distribution intratumorale dans un modèle animal d'un composé métallique utilisé dans le traitement de tumeurs.

2.3 Exemple d'application cellulaire : toxicité pulmonaire du Co

Nous avons collaboré pendant plusieurs années avec deux équipes du CEA pour étudier les mécanismes de toxicité du cobalt, élément produit par l'industrie nucléaire, dans le cadre du Programme interorganismes de toxicologie nucléaire. Avec l'équipe de Carole Bresson du CEA de Marcoule et l'équipe de Véronique Malard du CEA de Saclay, notre objectif était d'évaluer les effets cytotoxiques du cobalt soluble ($\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$) et particulaire (Co_3O_4) sur des cellules pulmonaires humaines en culture, et cela en relation avec la spéciation biochimique du cobalt dans le milieu de culture et à l'intérieur des cellules.

Toxicité du cobalt soluble ($\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$). L'imagerie de la distribution intracellulaire du cobalt a été réalisée sur des cellules épithéliales pulmonaires humaines (lignée BEAS-2B), choisies comme modèles des expositions par inhalation, une voie d'exposition occupationnelle importante rencontrée dans l'industrie électronucléaire. Tout d'abord, la cytotoxicité du cobalt a été évaluée sur les cellules après une exposition de 24 heures à des concentrations croissantes de cobalt dans le milieu de culture. La concentration de cobalt pour laquelle l'inhibition de la croissance est inférieure de 25 % (IC25) à celle des cellules non exposées s'est révélée être de $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les valeurs de concentration du cobalt pour les IC50 et IC75 étaient respectivement de 20 et $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Suite à quoi nous avons déterminé par la technique PIXE/RBS sur l'accélérateur AIFIRA du CENBG la distribution multi-élémentaire dans des cellules exposées au cobalt soluble. Nous avons révélé une distribution homogène du cobalt dans les cellules (figure 2B.7). L'analyse quantitative du cobalt intracellulaire pour des expositions aux IC25 et IC50 a montré une altération de l'homéostasie du Zn, cependant la concentration des autres éléments endogènes tels que K, Ca, Fe, Cu n'était pas modifiée (figure 2B.8) (Bresson 2013).

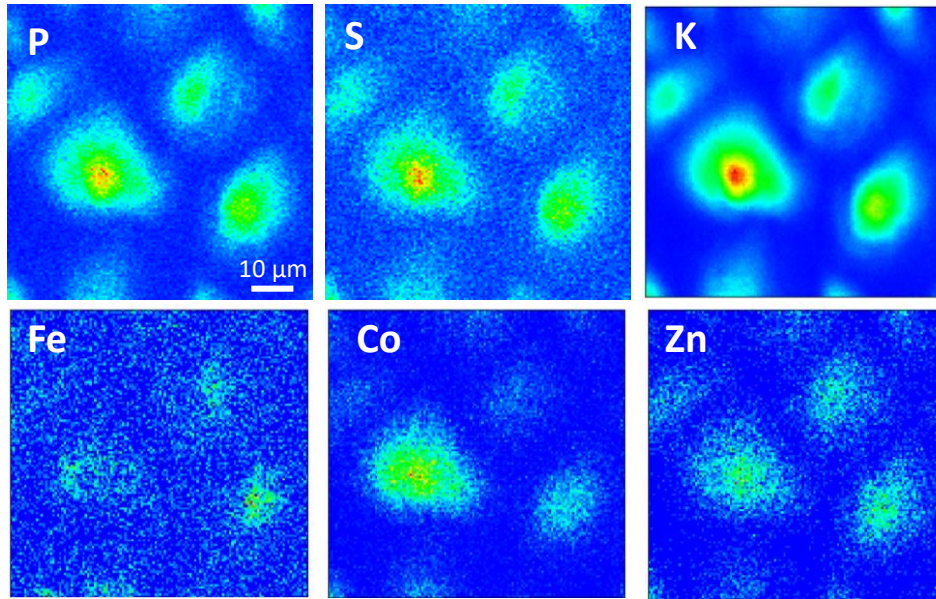


Figure 2B.7. Imagerie du phosphore, soufre, potassium, cobalt, et fer obtenue par analyse PIXE dans les cellules BEAS-2B exposées à $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cobalt soluble (Bresson 2013).

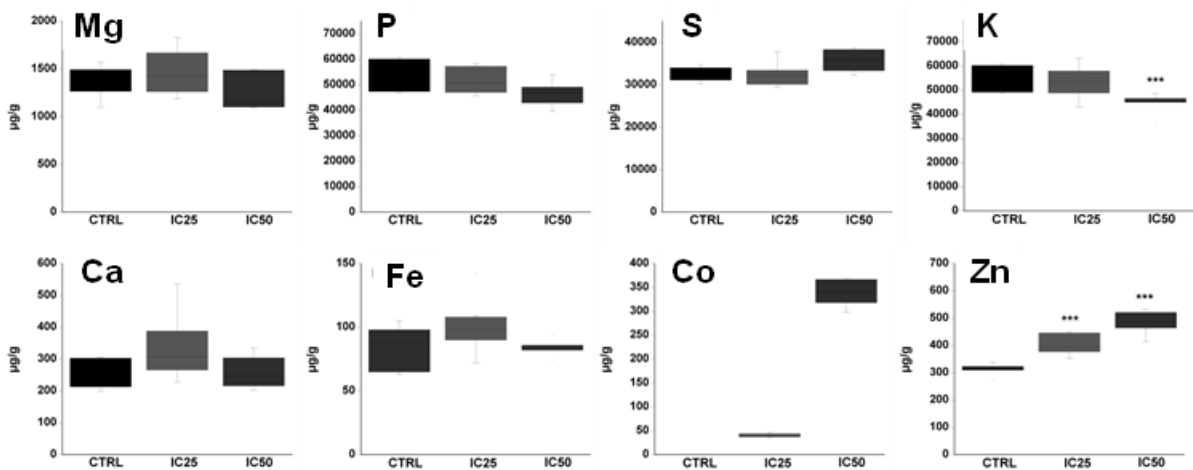


Figure 2B.8. Analyse quantitative PIXE/RBS de la teneur élémentaire (μg par gramme de masse sèche) dans les cellules BEAS-2B exposées au cobalt à 0 (CTRL), 8 (IC25) et 20 (IC50) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pendant 24 heures. Dans les boîtes à moustaches sont représentées, les valeurs médiane, maximale et minimale ainsi que les limites de 25 et 75 % de la population. Les étoiles indiquent les différences significatives par rapport au contrôle (Bresson 2013).

Ces résultats nous ont conduits à étudier plus en détail l'effet du cobalt sur l'homéostasie du Zn. Dans un premier temps, des expériences de toxicité ont été réalisées en combinant des expositions simultanées au cobalt et au zinc qui ont montré une toxicité accrue, de manière dose-dépendante (figure 2B.9). L'exposition seule au zinc dans le milieu de culture n'induit pas de toxicité et, d'un autre côté, l'exposition seule à $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cobalt conduit à une inhibition de 25% de la croissance (IC25). Mais la co-exposition à $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

de cobalt et $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de zinc conduit à une IC75 allant jusqu'à une IC95 pour le zinc à $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Une hypothèse est que le cobalt pourrait interagir avec les protéines de transport du zinc, soit en augmentant l'absorption du zinc par les cellules, soit en inhibant l'efflux de zinc. Dans les recherches bibliographiques nous avons trouvé que la protéine ZnT1 est impliquée dans l'efflux et dans le stockage du zinc dans le réticulum endoplasmique. Pour évaluer l'implication possible du ZnT1 dans l'accumulation de zinc, nous avons mesuré son expression par *western blots* dans des lysats de cellules exposées au zinc seul et co-exposées au zinc et au cobalt. Nous avons montré qu'une concentration non toxique de zinc est associée à une augmentation du ZnT1. En revanche, après exposition aux deux métaux, l'expression du ZnT1 a été réduite (figure 2B.9). Ce résultat suggère que le transport du zinc pourrait être inhibé en cas d'exposition au cobalt, grâce à la modulation de l'expression de la protéine ZnT1 par le cobalt. Aussi nos résultats mettent en garde sur un risque de toxicité ignoré jusqu'à présent puisque le Zn ne présente généralement qu'une très faible toxicité, or en cas de co-exposition avec le cobalt, la toxicité combinée du Zn et du Co devient préoccupante.

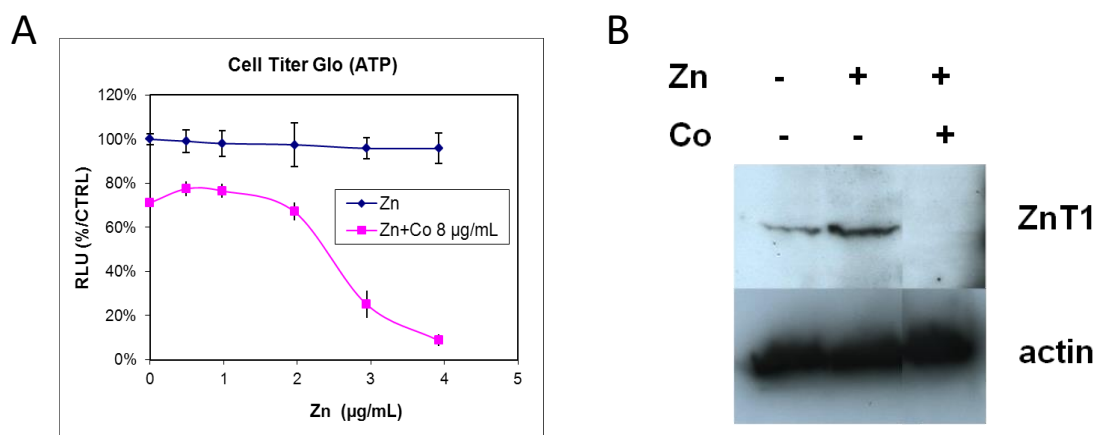


Figure 2B.9. (A) Cytotoxicité sur les cellules BEAS-2B à la suite d'une exposition croissante au zinc pendant 24 heures (courbe bleue) ou une co-exposition au zinc auquel on a ajouté du cobalt (courbe rose). (B) Expression de la protéine ZnT1 évaluée par western blot dans des lysats cellulaires provenant de cellules témoins, de cellules exposées au zinc, et exposées au zinc et cobalt ($2,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de zinc ; $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cobalt) (Bresson 2013).

Toxicité du cobalt particulaire (Co_3O_4). Bien que les particules d'oxyde de cobalt (Co_3O_4) présentent une faible toxicité *in vitro*, elles pourraient entraîner des effets néfastes à long terme sur les cellules pulmonaires *in vivo*, car elles ont un long temps de rétention dans le poumon. Une faible proportion de particules d'oxyde de cobalt peut rester dans les poumons pendant plusieurs mois ou années après l'inhalation. Pour étudier la toxicité du Co particulaire (Co_3O_4 'insoluble' dans l'eau), nous avons établi une relation entre l'exposition au cobalt insoluble, la quantité de cobalt dissous dans le milieu de culture et la quantité vraiment internalisée par les cellules, avec l'idée de discerner si la toxicité du cobalt particulaire vient de sa solubilité, même très faible. Nous avons évalué la cytotoxicité des particules d'oxyde de cobalt sur les cellules BEAS-2B après 72 heures d'exposition à des concentrations croissantes. Les résultats montrent que la toxicité de ces particules de cobalt est beaucoup plus faible que celle induite par le chlorure de cobalt soluble avec des durées d'exposition similaires (figure 2B.10).

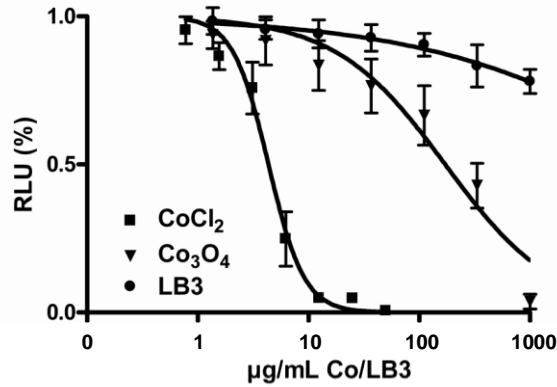


Figure 2B.10. Toxicité des particules de Co_3O_4 sur les cellules primaires BEAS-2B (A). Les cellules BEAS-2B étaient exposées à des particules de Co_3O_4 ($0 - 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{Co}$), à des billes de latex LB-3 ($0 - 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) comme témoins négatifs, ou à du cobalt soluble (CoCl_2) pendant 72 heures ($0 - 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{Co}$) (Ortega 2014).

La solubilisation intracellulaire des particules d'oxyde de cobalt est un point clé pour tenter de déterminer une relation entre le cobalt solubilisé intracellulaire et la toxicité. Nous avons utilisé l'analyse PIXE pour quantifier le cobalt provenant des particules intracellulaires et le cobalt total, ce qui permet de déterminer la fraction soluble à l'intérieur de la cellule (figure 2B.11). L'analyse quantitative a mis en évidence que la teneur en cobalt solubilisé intracellulaire après exposition aux particules de Co_3O_4 ($6,5 \text{ fg/cellule}$) est similaire à celle après exposition au composé soluble, CoCl_2 ($5,4 \text{ fg/cellule}$), pour les mêmes conditions de cytotoxicité (IC25). Cela veut dire que les particules d'oxyde de cobalt se dissolvent à l'intérieur des cellules et que la toxicité du cobalt particulaire est due aux formes solubles (Co^{2+}) retrouvées en quantité infime dans les cellules (IC25 0,07 % solubilisation, IC50 0,55 % solubilisation). Nous pensons que de manière générale la toxicité des particules métalliques dites « insolubles » est due essentiellement à leur solubilisation lente en milieu biologique venant se substituer aux métaux essentiels et provoquer une toxicité spécifique. Ce nouveau paradigme pose le problème de l'évaluation de la toxicité des particules métalliques de faible solubilité et de faible clairance, comme c'est le cas des particules d'oxyde de cobalt dans les poumons qui peuvent résider dans les organes exposés pendant des périodes longues (effet cheval de Troie) (Ortega 2014).

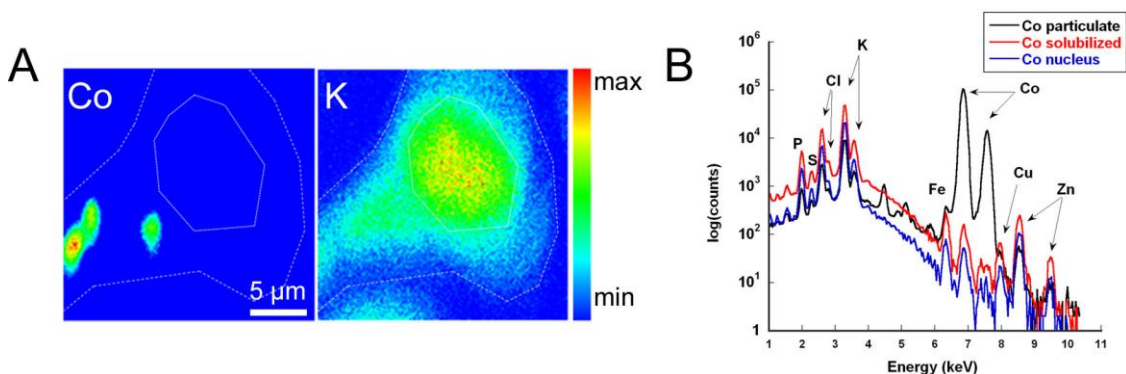


Figure 2B.11. Exemple d'analyse micro-PIXE d'une seule cellule BEAS-2B exposée à des particules d'oxyde de cobalt ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{Co}$) pendant 72 heures (IC25). La distribution du potassium délimite les limites de la cellule et la position du noyau (A). La fraction la plus élevée de cobalt se trouve dans le cytoplasme dans sa forme particulaire. Une petite fraction du cobalt est solubilisée, comme le montre le spectre local PIXE à l'extérieur des particules d'oxyde de cobalt (B) (Ortega 2014).

2.4 Exemple d'application aux tissus : imagerie intratumorale du Gd

Les nanoparticules métalliques ont un grand potentiel dans le traitement du cancer comme médicaments théranostiques en combinant leurs propriétés d'agents de contraste pour l'imagerie médicale et de radiosensibilisation. Comme tout autre médicament anticancéreux, la diffusion intratumorale dépend du mode d'administration et de l'affinité pour les cellules cancéreuses, les deux principaux facteurs limitant l'efficacité thérapeutique.

Nous avons collaboré avec Yolanda Prezado de l'IMNC (Imagerie et Modélisation en Neurobiologie et Cancérologie) et Frédéric Pouzoulet de l'Institut Curie, tous les deux à Paris, avec l'objectif de déterminer la distribution quantitative des nanoparticules de gadolinium après une injection intratumorale directe sur un modèle animal. Nous nous sommes servis des techniques PIXE et RBS, avec un faisceau de protons d'une résolution spatiale de 2 μm pour déterminer la distribution quantitative du gadolinium dans des sections de tumeurs de plusieurs centimètres. Nous avons fait usage de particules AGuIX (*Activation and Guiding of Irradiation by X-ray*), des particules de 3 nm composées d'un réseau de polysiloxanes entouré de chélateurs de gadolinium, et comme modèle tumoral nous avons utilisé des tumeurs de glioblastome humain U87 greffées chez la souris (Carmona 2017).

Les figures 2B.12 et 2B.13 montrent les distributions de Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe et Gd dans deux sections de glioblastomes xéno greffés provenant de différents animaux. Dans les deux cas, les distributions de Gd et de Si dans les tumeurs entraînent leur diffusion hétérogène. Les deux éléments suivent le même schéma de distribution puisque les nanoparticules AGuIX sont composées d'un réseau de polysiloxanes entouré de chélateurs de gadolinium. Le Gd et le Si se trouvent à des concentrations élevées près du point d'injection et diminuent rapidement dans le reste de la tumeur. La distribution du potassium met en évidence des nodules intratumoraux d'environ 1 mm de diamètre délimitant des amas cellulaires de densités variables. Les nanoparticules du gadolinium semblent s'accumuler autour de ces sous-domaines intratumoraux probablement liés aux variations de la densité cellulaire.

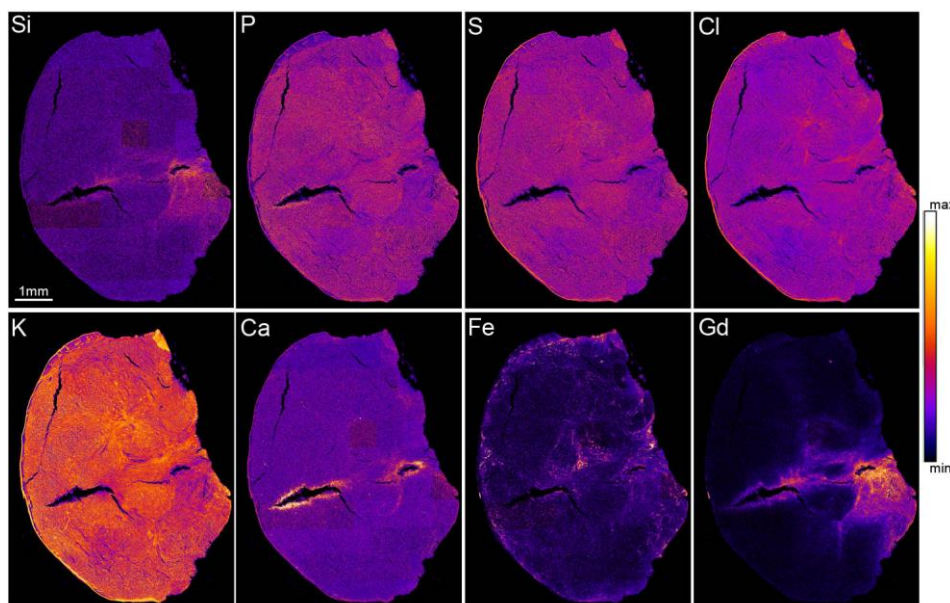


Figure 2B.12. Distribution du Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe et Gd dans une première tumeur de glioblastome. Les intensités des rayons X pour chaque élément mesuré par PIXE ont été normalisées par la charge locale déposée, mesurée par RBS. Les niveaux d'intensité des rayons X passent du minimum en noir/violet au maximum en jaune/blanc, comme le montre l'échelle des couleurs. Analyses PIXE réalisées à AIFIRA (Carmona 2017).

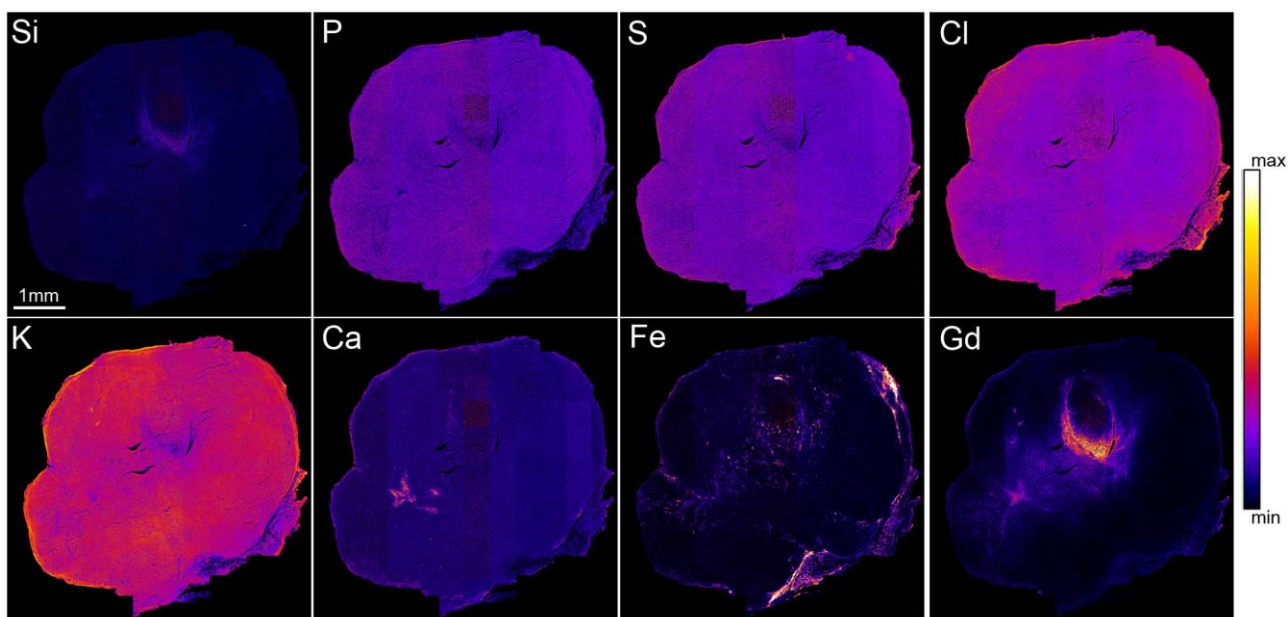


Figure 2B.13. Distribution du Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe et Gd dans une seconde tumeur de glioblastome. Les intensités des rayons X pour chaque élément mesuré par PIXE ont été normalisées par la charge locale déposée, mesurée par RBS. Les niveaux d'intensité des rayons X passent du minimum en noir/violet au maximum en jaune/blanc, comme le montre l'échelle des couleurs. Analyses PIXE réalisées à AIFIRA (Carmona 2017).

En comparant les images RBS et PIXE avec les coupes histologiques (figure 2B.14) nous montrons la présence de Gd dans le tissu extra-tumoral, plus concrètement dans le tissu musculaire adjacent. Nous avons quantifié la teneur en éléments dans différentes zones de la section tumorale (figure 2B.14) : les zones éloignées du point d'injection (5, 6, 7), les zones proches du point d'injection mais présentant un degré élevé d'hétérogénéité de Gd (8a, 8b) et de tissu musculaire (9). Les données quantitatives pour chacune de ces régions sélectionnées sont présentées dans la figure 2B.15.

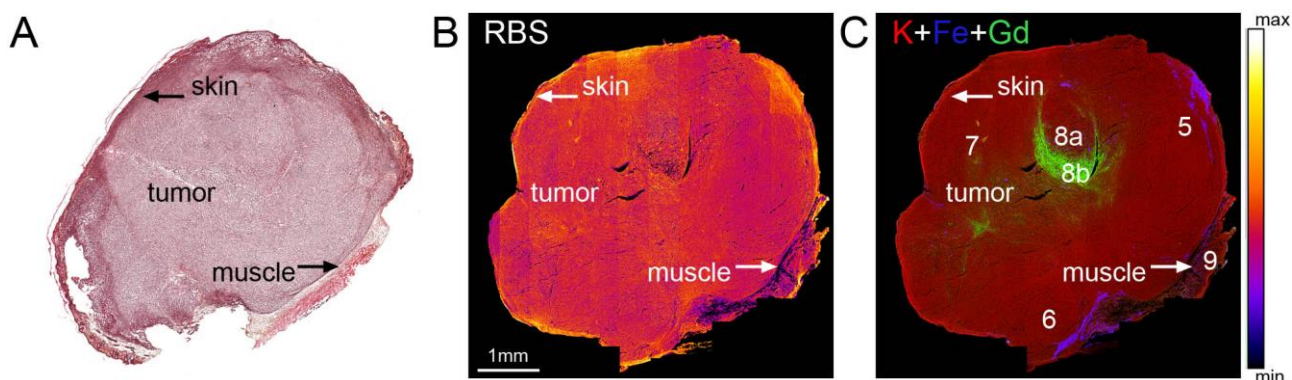


Figure 2B.14. (A) Coupe histologique de la deuxième tumeur; (B) image RBS de la distribution de la matrice (C, N, O) et (C) superposition des images PIXE des distributions du potassium (rouge), du fer (bleu) et du gadolinium (vert). Les nombres indiquent les zones quantifiées (Carmona 2017).

L'analyse quantitative montre que la distribution quantitative de Gd dans la tumeur est très hétérogène, 57 % du gadolinium est accumulé dans 13 % de la surface de la tumeur. Les concentrations minimales de Gd dans les deux échantillons analysés sont respectivement de 37 et 61 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ et les concentrations maximales sont respectivement de 10 700 et 10 200 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Toutes les régions tumorales contiennent du Gd mais avec des concentrations nettement différentes (ratio jusqu'au 250). La distribution du fer est très hétérogène, comme on pouvait s'y attendre en raison de la grande hétérogénéité et de la disposition chaotique du système vasculaire dans les tumeurs. Les autres éléments, P, S, Cl, K, Ca, Cu, Zn présentent une concentration assez homogène dans les zones analysées. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que l'injection directe de nanoparticules de Gd dans les glioblastomes entraîne une diffusion hétérogène des nanoparticules dans la masse tumorale. En conclusion, toutes les régions de la tumeur contiennent du Gd mais avec des concentrations nettement différentes, et la diffusion n'est pas limitée à la tumeur puisqu'elle peut atteindre le tissu sain adjacent.

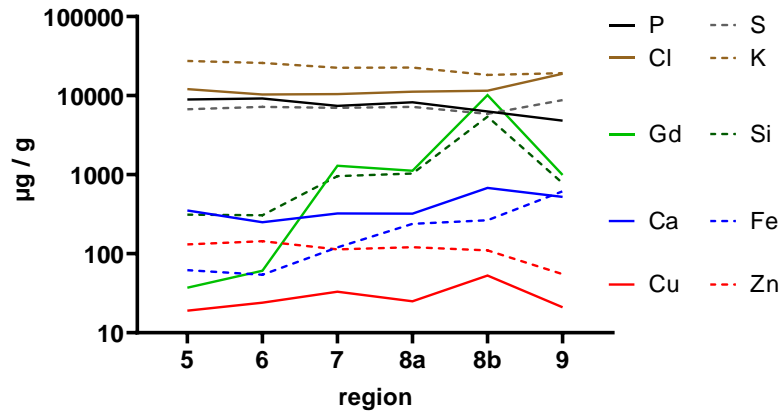


Figure 2B.15. Concentration des éléments chimiques dans la seconde section tumorale, exprimée en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de masse sèche et effectuée en combinant PIXE et RBS (AIFIRA).

3. Imagerie des éléments chimiques par rayonnement synchrotron

3.1 Caractéristiques d'une installation synchrotron

Lorsqu'une particule chargée est soumise à une accélération, elle est déviée de sa trajectoire rectiligne et celle-ci émet des rayonnements électromagnétiques. Quand des électrons sont produits et accélérés dans une installation de type synchrotron, la lumière émise par ces électrons relativistes soumis à une accélération centripète s'appelle le rayonnement synchrotron.

Le rayonnement synchrotron présente des caractéristiques qui lui confèrent des qualités pour l'analyse spectroscopique bien supérieures à celles offertes par les sources classiques de lumière (Bertsch 2001). La continuité spectrale, de l'infrarouge lointain jusqu'aux rayons X, n'est atteinte par aucune autre source sur une aussi large plage de longueurs d'onde. La faible divergence d'émission dans le plan vertical, de l'ordre de 0,1 mrad, conduit à une brillance bien supérieure à celle des tubes de rayons X et permet une excellente focalisation des faisceaux. L'intensité du rayonnement synchrotron est de plusieurs ordres de grandeur supérieure à celle des générateurs de rayons X. Du fait de toutes ces caractéristiques, plusieurs installations de rayonnement synchrotron ont été construites à travers le monde.

Le fonctionnement d'un accélérateur de type synchrotron relève de trois étapes principales. Tout d'abord des électrons sont émis par un canon à électrons puis accélérés dans un accélérateur linéaire (linac) par des champs électriques jusqu'à atteindre une énergie de l'ordre de centaines de MeV. Ils sont ensuite envoyés dans un « booster » où ils vont gagner de l'énergie à chaque tour, jusqu'à atteindre une énergie de l'ordre du GeV, ils sont donc injectés dans l'anneau de stockage (figure 3B.1). Dans cet anneau, les électrons circulent sous des conditions d'ultravide de 10^{-9} mbar, à une vitesse relativiste et pendant des heures. Tout au long de ce parcours, les électrons passent par différents types des champs magnétiques qui les dévient de leurs trajectoires, perdant ainsi de l'énergie sous forme de rayonnement électromagnétique. Les principaux éléments de déviation sont les « aimants de courbure » (des aimants qui forcent les électrons à changer de direction), les onduleurs (constitués de petits aimants polarisés alternés forçant les électrons à suivre une trajectoire oscillante mais globalement rectiligne) et l'aimant focalisateur (lentilles électromagnétiques pour focaliser le faisceau de manière qu'il soit aussi étroit que possible). L'énergie émise par les électrons après

leur déviation par l'un de ces éléments est transportée à la ligne de faisceau ou ligne de lumière. Les lignes de lumière sont composées de trois cabines : optique (contient les éléments optiques qui servent à sélectionner la taille et l'énergie du faisceau), expérimentale (comprend le dispositif de montage de l'échantillon, des éléments de focalisation ainsi que les différents détecteurs) et de contrôle (permet de piloter les analyses). Chaque ligne de faisceau a des caractéristiques bien à elle, comme la zone spectrale du faisceau incident, l'intensité, et le système de focalisation, donc la résolution spatiale. L'ensemble de ces caractéristiques va faire qu'une ligne soit plus appropriée qu'une autre pour certains types d'analyses et techniques.

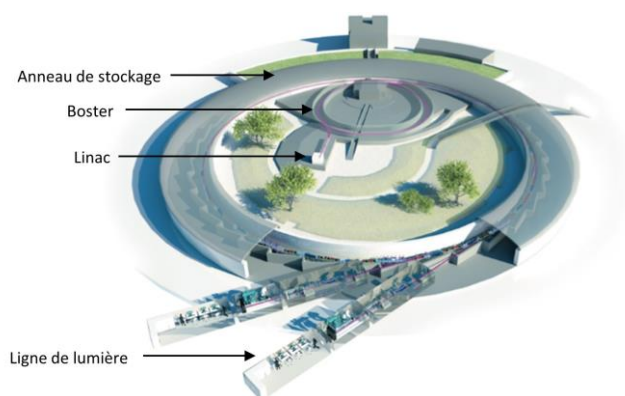


Figure 3B.1. Schéma montrant les principales structures d'une installation de rayonnement synchrotron.

Les progrès récents dans la fabrication des optiques de focalisation pour le rayonnement synchrotron ont permis la construction de lignes de nano-analyse auprès d'installations synchrotron de troisième génération (Da Silva 2017). Des lignes synchrotron, opérant dans le spectre énergétique des rayons X durs, permettent la mise en œuvre, à l'échelle micro et nanoscopique, des techniques de fluorescence X induite par rayonnement synchrotron (μ -SXRF et nano-SXRF), et d'absorption de rayonnement X (μ -XAFS) (da Silva 2017). Nous avons employé ces techniques pour analyser les distributions intracellulaires d'éléments chimiques et pour déterminer la spéciation des états d'oxydation à l'intérieur cellulaire. Pour mener à terme mes recherches, j'ai travaillé sur différentes lignes de lumière auprès de différents accélérateurs, ESRF, SOLEIL, DESY ou APS. Ultérieurement, je décrirai brièvement ces lignes et leurs principales caractéristiques, il faut cependant noter que les systèmes de focalisation et de détection sont en constante évolution et amélioration.

3.2 Fluorescence de rayons X par synchrotron (SXRF) et Spectroscopie de structure près du seuil d'absorption des rayons X (XANES)

Les techniques SXRF et PIXE sont similaires dans leur approche fondamentale et sont fondées sur le fait commun que lorsqu'un électron est éjecté de l'enveloppe interne d'un atome, un électron d'une enveloppe supérieure tombe dans cette enveloppe inférieure pour remplir le trou laissé derrière, en émettant en même temps un photon d'une énergie égale à la différence d'énergie entre les deux couches électroniques impliquées. La principale différence entre SXRF et PIXE réside dans le mode d'excitation, des rayons X pour le premier, des protons pour le deuxième (Figure 2B.3).

À l'instar de la méthode PIXE, la fluorescence X induite par rayonnement synchrotron est une méthode d'analyse non destructive parfaitement adaptée à l'imagerie des éléments chimiques en faible teneur ; de plus elle peut atteindre des résolutions spatiales et des limites de détection beaucoup plus performantes (Adams 1998). Grâce au spectre continu en énergie et au haut flux et intensité des sources synchrotron, il est possible de sélectionner, à l'aide d'un monochromateur, l'énergie des photons incidents et travailler avec un faisceau monochromatique à n'importe quelle énergie dans l'intervalle des rayons X durs. L'énergie retenue doit se situer juste au-dessus de la raie d'absorption de l'élément recherché, ce qui permet d'augmenter considérablement le rapport signal/bruit et de reculer les limites de détection par rapport aux installations classiques de fluorescence X. Le haut flux et la faible divergence du rayonnement synchrotron peuvent être exploités par les systèmes de focalisation (lentilles de Fresnel, miroirs de type Kirkpatrick-Baez) en réduisant la taille du faisceau à des dimensions micrométriques, voire nanométriques (Hignette 2005, 2007).

La technique XANES (*X-ray Absorption Near Edge Structure*) est fondée sur la mesure du coefficient d'absorption quand un faisceau de rayons X traverse un échantillon (Ortega 2012). Cette technique fournit principalement des informations sur la géométrie et l'état d'oxydation de l'élément d'intérêt. La loi de Beer-Lambert permet de relier l'intensité du faisceau incident (I_0) et l'intensité transmise après traversée de l'échantillon (I), au coefficient d'absorption linéaire $\mu(E)$ du matériau selon la formule suivante : $I = I_0 e^{-\mu(E)x}$. Le coefficient $\mu(E)$ dépend de l'énergie du faisceau incident et présente de fortes discontinuités à des énergies particulières, correspondant aux énergies de liaison des électrons du solide. Ces discontinuités appelées seuil d'absorption sont associées à l'excitation d'un électron depuis un niveau de cœur particulier vers un état vide.

Le spectre d'absorption de rayonnement X représente donc la variation du coefficient d'absorption linéaire μ en fonction de l'énergie E du faisceau incident. L'absorption se produit quand les rayons X incidents ont une énergie suffisante pour éjecter un électron du noyau d'un atome par effet photoélectrique. Quand ce processus a lieu, l'intensité du faisceau après la traversée varie considérablement par rapport à l'intensité initiale. Pour des faibles concentrations élémentaires, la mesure de l'intensité de fluorescence totale est le mode le plus approprié pour détecter ces changements d'intensité. Dans ce cas, l'intensité des rayons X secondaires émis (I_f) est proportionnelle au coefficient d'absorption $\mu(E)$ comme indiqué : $\mu(E) \approx I_f/I_0$. Le processus subatomique impliqué dans la fluorescence des rayons X est la relaxation radiative de l'élément à la suite de l'éjection d'un électron central. Lorsque l'éjection d'électrons d'une enveloppe interne se produit, des électrons des enveloppes externes remplissent les vides et émettent des rayons X avec des énergies caractéristiques et dépendant des niveaux électroniques impliqués.

Au voisinage immédiat de l'énergie du seuil d'absorption, à moins de 50 eV, on observe parfois d'autres structures, ou résonances qui proviennent des transitions entre les orbitales de l'atome absorbeur. Elles reflètent la symétrie du site et l'état électronique de l'élément excité qui renseignent sur les liaisons chimiques auxquelles participe cet atome. La spectroscopie d'absorption près du seuil d'absorption (figure 3B.2) fournit des informations sur l'ordre local autour de l'atome absorbeur. Au-dessus du seuil d'absorption, nous nous retrouvons dans la technique EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*) qui fournit des informations sur des distances interatomiques, la coordination et également le désordre thermique. Mais je ne parlerai pas de cette technique puisque je ne l'ai pas mise en œuvre dans mes recherches, je m'intéresse aux éléments trace et ultratrace dans les cellules, et les faibles concentrations de ces éléments ne permettent pas d'obtenir de signal suffisant pour bien interpréter un spectre EXAFS.

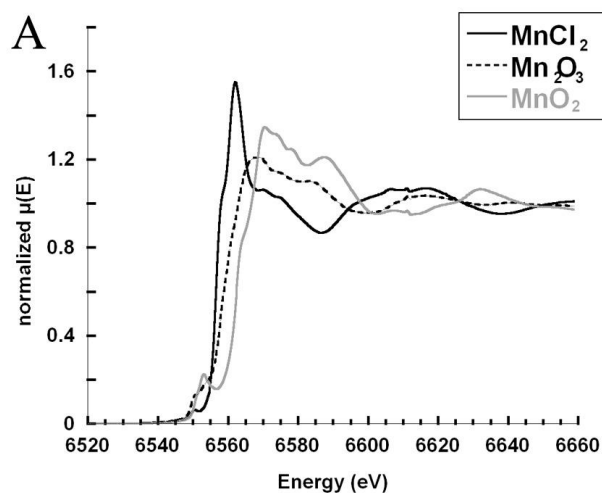


Figure 3B.2. Spectres XANES correspondant à différents composés de manganèse. La forme du spectre varie aux alentours du seuil d'absorption du manganèse en fonction de son état d'oxydation. Ligne ID21 à l'ESRF (Carmona 2014).

3.3 Lignes de lumière synchrotron

Nous sommes intéressés par la détermination des éléments à l'état de trace dans des échantillons biologiques, principalement des cellules isolées. Pour mener à bon terme nos recherches, nous avons besoin de lignes de lumière avec une haute résolution spatiale et un grand flux de photons incidents. L'énergie du faisceau de rayons X incident doit être telle qu'elle puisse exciter les éléments biologiques d'intérêt. Le système de détection doit être adapté aux techniques SXRF et XANES, de même la cabine expérimentale doit être dotée de la possibilité d'analyser des échantillons biologiques et fins, elle doit notamment être équipée d'un microscope optique pour la sélection de cellules.

Chaque synchrotron et ligne d'analyse présente des caractéristiques bien définies et en fonction des besoins expérimentaux nous devons choisir la ligne la plus adaptée. Au début, pour l'analyse par SXRF des cellules isolées à température ambiante, nous avons eu recours à l'ESRF aux lignes ID19 et ID22NI, lignes qui, aujourd'hui, ne sont plus dédiées à la fluorescence des rayons X. L'évolution de la station ID22NI à donner naissance aux lignes actuelles ID16A et ID16B (Martinez Criado 2015 ; da Silva 2017). Plus récemment, nous avons aussi travaillé sur les lignes Nanoscopium à SOLEIL et P06 à DESY. Pour l'analyse de l'état d'oxydation des métaux dans les cellules par la technique XANES, il est nécessaire de maintenir les échantillons dans un environnement congelé-hydraté et nous avons fait appel à la ligne ID21 de l'ESRF. Avec les récentes améliorations des systèmes de focalisation, nous avons vu naître de nouvelles lignes de faisceau, comme ID16A à l'ESRF qui nous a permis d'analyser des terminaisons synaptiques et de discerner une compartimentation des métaux à l'intérieur. Récemment, cette ligne de lumière a été équipée d'un cryostat, ce qui signifie que les analyses seront menées dorénavant sur des cellules congelées-hydratées. Pendant l'upgrade de l'ESRF, nous avons fait appel à la ligne 9-ID-B de l'APS, laquelle présente aussi une grande résolution spatiale, en dessous de 100 nm, et permet aussi l'analyse d'échantillons biologiques à l'état congelé-hydraté.

a. Anciennes lignes de lumière à l'ESRF

La première fois que nous avons utilisé la technique SXRF pour l'imagerie à haute résolution spatiale nous avons adapté la cabine expérimentale de la ligne ID19 avec un système de détection pour la fluorescence des rayons X (Ortega 2007). Un dispositif expérimental original avait été mis au point pour réaliser l'imagerie des éléments chimiques par fluorescence (SXRF) avec une résolution spatiale de 90 nm, un faisceau d'énergie entre 15 et 17 keV et un flux de l'ordre de 10^{12} ph·s⁻¹. Cette résolution spatiale, combinée à une luminosité élevée, avait permis, pour la première fois au monde, d'imager les éléments chimiques à l'intérieur des cellules, dans des compartiments subcellulaires (figure 3B.3). Ce dispositif expérimental a ensuite été installé sur la ligne ID22NI de l'ESRF, laquelle présentait des caractéristiques bien similaires et que nous avons également souvent utilisée (figure 3B.4).

Ces premières expériences ont été menées à température ambiante sur des échantillons cryofixés et lyophilisés (processus qui permettent de préserver la structure et le contenu élémentaire des cellules). Nous avons montré que le fer est localisé à l'intérieur de la cellule en structures dites « vésiculaires », il se retrouve dans le cytoplasme, les ramifications et les terminaisons cellulaires. La localisation du fer, mise en évidence par nano-SXRF, dans des structures vésiculaires (figure 3B.4) ressemble à la distribution de la dopamine (figure 3B.3). Nous avons réalisé d'autres expériences de quantification par faisceau d'ions démontrant un détournement d'incorporation du fer dans les cellules après perturbation de la synthèse de dopamine, ce qui nous a permis de suggérer que le métabolisme du fer et de la dopamine interagissent dans les cellules dopaminergiques.

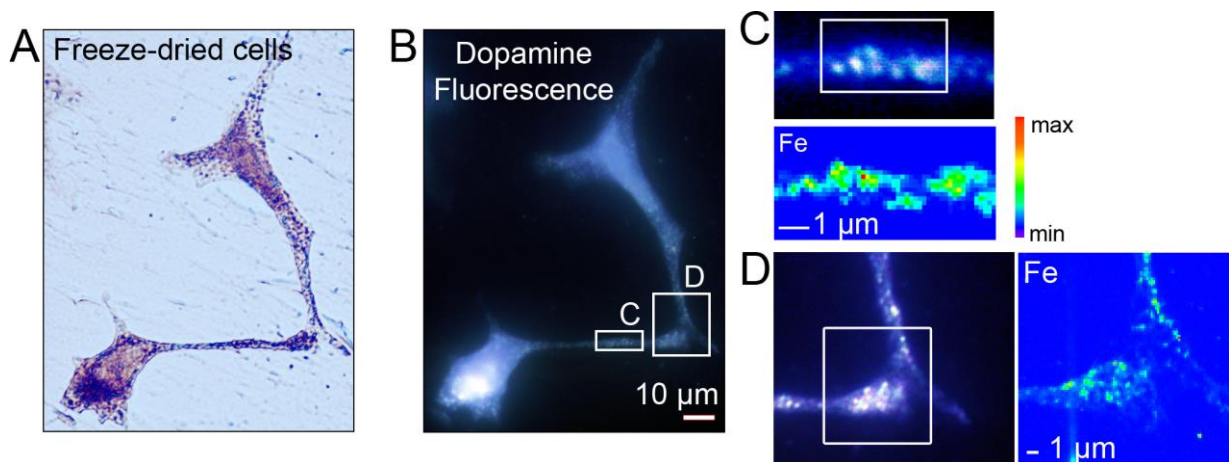


Figure 3B.3. Le fer semble être localisé dans les vésicules de dopamine. (A) cellules lyophilisées observées avec la lumière visible, (B) microscopie à épifluorescence, sur les mêmes cellules lyophilisées, permettant l'identification de la dopamine oxydée, (C et D) images représentant la distribution du fer, obtenu par μ -SXRF sur la ligne ID19, en comparaison avec la distribution de la fluorescence de la dopamine oxydée (Ortega 2007).

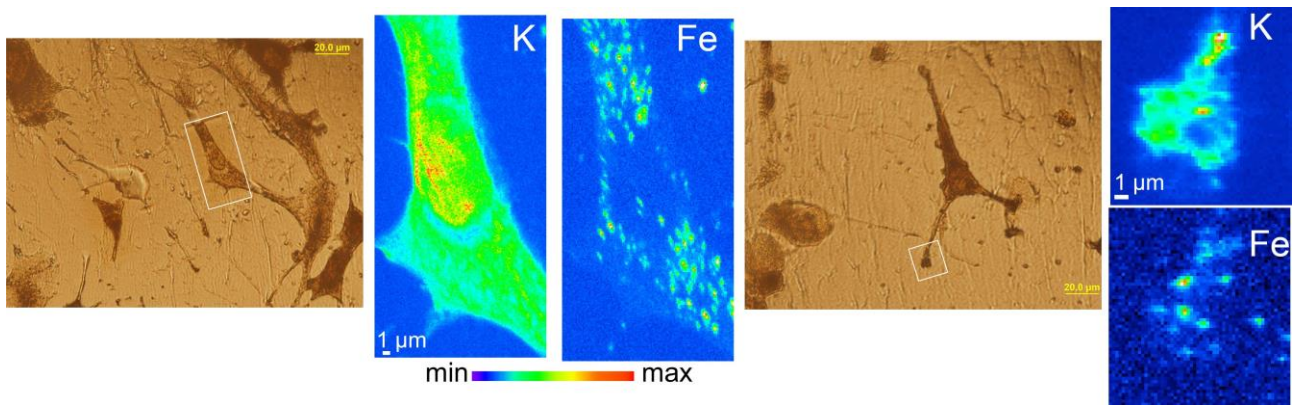


Figure 3B.4. L'imagerie chimique par rayons X synchrotron révèle la distribution sub-cellulaire du fer dans des structures de type vésiculaire. Le fer est dans le cytoplasme et les terminaisons cellulaires. Images obtenues sur ID22NI à l'ESRF avec un faisceau d'une taille inférieure à 90 nm (Carmona 2008 b).

b. Ligne ID21 à l'ESRF

La ligne ID21 du synchrotron ESRF permet de combiner l'analyse μ -SXRF et μ -XANES dans des échantillons biologiques (<https://www.esrf.eu/UsersAndScience/Experiments/XNP/ID21>). Pour assurer la préservation de l'état de spéciation des éléments, cette ligne est équipée d'un cryo-stage refroidi à l'azote liquide où le maintien de la température de l'échantillon se fait par contact thermique. ID21 permet de travailler dans la gamme des rayons X d'énergie comprise entre 2 et 9 keV, le faisceau est focalisé avec des lentilles de Fresnel jusqu'à $0,4 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ avec un flux de l'ordre de quelque $10^9 \text{ph}\cdot\text{s}^{-1}$. Pour l'étude des échantillons peu concentrés, la technique micro-XANES peut être réalisée en mode de fluorescence en utilisant des détecteurs de silicium de grande surface active pour les deux techniques (Salomé 2013).

Cette ligne était particulièrement adaptée à notre étude sur la détermination de l'état d'oxydation du manganèse à l'intérieur des cellules exposées à différents composés environnementaux. Tout d'abord nous avons implémenté la technique μ -SXRF, où l'échantillon est aligné dans le plan focal et déplacé devant le microfaisceau pour recueillir des images des éléments en 2D. Une fois l'image de l'élément d'intérêt reconstruite, dans notre cas le manganèse, nous avons déterminé par μ -XANES l'état d'oxydation. Nous avons mis en œuvre la technique μ -XANES en mesurant la fluorescence émise par l'échantillon autour de l'énergie du seuil d'absorption du manganèse (6,520 à 6,660 keV) dans différents endroits à l'intérieur de l'appareil de Golgi de la cellule. Nous avons conservé nos cellules dans un état congelé-hydraté tout au long des analyses et en amont (Carmona 2014).

c. Nanoscopium à SOLEIL

La ligne Nanoscopium du synchrotron français SOLEIL et la ligne P06 du synchrotron allemand PETRAIII à DESY présentent des caractéristiques similaires en matière d'énergie, résolution spatiale et flux ; elles sont une très bonne alternative aux anciennes lignes μ -SXRF de l'ESRF. Elles permettent, toutes les deux, de travailler avec un faisceau de rayons X durs qui peut être focalisé jusqu'à quelques centaines de microns, tout en maintenant une intensité de faisceau compatible avec l'analyse des éléments trace à l'intérieur des cellules.

Le synchrotron SOLEIL est un synchrotron français situé à Saint-Aubin près de Paris. La ligne Nanoscopium mesure 155 m de long et permet de travailler dans la gamme des rayons X durs entre 5 et 20 keV (Somogyi 2015). Le faisceau est focalisé dans la cabine expérimentale au moyen d'une lentille de Fresnel et de miroirs Kirkpatrick-Baez à couches multiples (ou miroirs KB), la taille minimale qui peut être atteinte est de 75 nm × 100 nm avec un flux de photons de l'ordre de 10^9 photons·s⁻¹. Pour la technique SXRF, cette ligne est équipée de deux détecteurs de silicium situés à un angle de 20° de chaque côté de l'échantillon, et les analyses sont menées à température ambiante. Grâce à la large gamme d'énergie du faisceau incident disponible, cette ligne est particulièrement adaptée à l'étude des éléments plus lourds, comme l'uranium. Nous pouvons exciter les électrons de la couche L de l'uranium (aux alentours de 17 keV) et détecter l'émission de fluorescence X de cette couche qui est située dans une gamme d'énergie optimale pour la détection avec de détecteurs de silicium. Le flux de photons et la résolution spatiale étant liés de manière inverse, nous devons souvent faire un compromis. Pour l'analyse des éléments trace nous avons besoin de flux et pour l'analyse intracellulaire de résolution, un bon compromis dans cette ligne a été trouvé avec une résolution de 300 nm et un flux de quelque 10^{10} photons·s⁻¹ (Carmona 2021).

d. Ligne P06 à DESY

La ligne P06 (*Hard X-ray micro/nano-probe*) du synchrotron PETRAIII à DESY (*Deutsches Elektronen-Synchrotron*) est une installation polyvalente orientée vers la microscopie de fluorescence à rayons X à balayage, la spectroscopie d'absorption des rayons X et le contraste de phase. Cette ligne est dotée de deux cabines expérimentales : microsonde (Boesenberg 2016) et nanosonde (Schroer 2016). La ligne est dotée de deux monochromateurs qui permettent de sélectionner l'énergie du faisceau entre 3 et 50 keV. Le faisceau est focalisé au moyen de miroirs KB avec la possibilité d'utiliser des lentilles de Fresnel pour des petites énergies. Dans la cabine nanosonde, la taille minimale du faisceau dépend de l'énergie incidente et peut atteindre entre 50 et 120 nm, en conséquence le flux aussi varie entre 10^7 et 10^9 ph·s⁻¹. Dans la cabine microsonde, le faisceau peut être focalisé à une taille de 450 nm × 450 nm avec un flux de l'ordre de 10^{10} photons·s⁻¹. Cette ligne se caractérise par son système de détection des rayons X, composé d'un détecteur MAIA de grand angle solide et placé en géométrie de rétrodiffusion (Boesenberg 2016) et qui limite la gamme spectrale entre 5 et 19,5 keV. Pour l'analyse de la distribution du manganèse dans les cellules, nous avons trouvé des conditions optimales en travaillant avec un faisceau à 10 keV, focalisé à 700 nm × 800 nm (vertical), donnant un flux de quelque 10^{10} photons·s⁻¹ et recueillant l'émission X avec le détecteur Maia en rétrodiffusion (Carmona 2019 a).

e. Ligne ID16A à l'ESRF

Nous avons utilisé la ligne ID16A (*Insertion Device 16 A*) du synchrotron ESRF pour la nano-imagerie de fluorescence X et le contraste de phase à très haute résolution (da Silva 2017). Elle permet d'étudier la composition chimique et la morphologie de l'échantillon, et les analyses peuvent être réalisées en 2D ou en 3D (tomographie). Cette ligne de lumière nous a permis de gagner en résolution spatiale et d'imager la composition élémentaire à l'intérieur des compartiments neuronaux tels que les synapses. Le flux sans précédent de cette ligne nous a permis de détecter des éléments présents en quantité d'attogrammes, grâce à quoi nous avons mis en évidence une compartimentation de cuivre et zinc à l'intérieur des synapses. Ces analyses ont été menées dans un premier temps à température ambiante. Les seuls supports adaptés au

porte-échantillon de cette ligne sont des fenêtres de nitrure de silicium (Si_3N_4), et comme nous le verrons il n'a pas été facile de rendre compatible la culture des neurones, transfection et cryopréservation sur ces supports. Actuellement, pour mieux préserver les échantillons pendant les analyses, cette ligne est dotée d'un système de refroidissement, à la température de l'azote liquide. Donc, à présent, toutes les analyses pourront se réaliser sur des échantillons congelés-hydratés.

Comme caractéristiques notables, cette ligne permet de travailler dans la gamme des rayons X durs ($> 10 \text{ keV}$) ; concrètement elle possède deux onduleurs qui fournissent une source de 17 keV ou de 33,6 keV. La ligne mesure 185 m de long et comprend, entre autres, deux paires de miroirs de focalisation KB, une pour chacune des énergies, qui permettent de travailler à très haute résolution spatiale avec une taille de faisceau pouvant descendre jusqu'à 13 nm (da Silva 2017). ID16A présente un flux supérieur à $10^{12} \text{ photons}\cdot\text{s}^{-1}$ à $\Delta E/E \sim 1\%$ ce qui lui confère une très haute sensibilité. Elle est dotée de deux détecteurs à dispersion d'énergie disposés de part et d'autre de l'échantillon, ce qui rend possible la détection de très faibles concentrations d'éléments, et présente également un microscope optique à longue distance de travail permettant de placer l'échantillon dans le plan focal.

f. Ligne 9-ID-B (Bionanoprobe) à l'APS

La ligne Bionanoprobe est dédiée à la fluorescence des rayons X aussi bien en mode cryogénique qu'à température ambiante. Elle permet de travailler dans la gamme des rayons X durs, entre 4,5 et 30 keV. Le faisceau est focalisé sur l'échantillon à l'aide de lentilles de Fresnel. Huit lentilles de Fresnel ont été installées pour couvrir une large gamme de tailles de faisceau focalisé pour différentes énergies incidentes, le tout en optimisant le flux. Cette ligne présente une très haute résolution spatiale avec une taille de faisceau pouvant descendre jusqu'à 50 nm. Les spectres de fluorescence des rayons X sont recueillis à l'aide d'un détecteur Vortex à quatre éléments, placé à 90° par rapport au faisceau. Un poste de travail hors ligne est utilisé pour pouvoir monter jusqu'à quatre échantillons congelés sur un porte-échantillon en aluminium et les introduire dans la cabine d'analyse. Ce poste de travail est refroidi à l'azote liquide et, pendant le transfert ou le stockage, des couvercles en cuivre sont utilisés pour protéger les échantillons contre d'éventuels dommages tels que des changements de température ou l'apparition de gel (Chen 2016).

Pendant l'upgrade et la fermeture provisoire de l'ESRF, nous avons fait appel pour la première fois aux capacités de cette ligne de nano-analyse. Nous avons imagé la distribution des éléments chimiques à l'intérieur de cônes de croissance de neurones en culture. Nous avons marqué deux protéines du cytosquelette, actine et tubuline, cherchant à voir une compartimentation de Cu et Zn par rapport à la distribution de ces protéines. L'analyse de petites structures comme les cônes de croissance (maximum $5 \mu\text{m}$ de largeur) nécessite un petit faisceau, nous avons travaillé avec une résolution spatiale entre 85 et 100 nm qui nous permettait d'avoir un flux de quelque $10^9 \text{ photons}\cdot\text{s}^{-1}$. Nous avons mis en évidence que les éléments chimiques semblent se concentrer au bout du cône de croissance, ce qui fait penser à une accumulation due à des processus biologiques liés à la plasticité (Carmona 2022).

4. La microscopie photonique : marquage des protéines

Je viens de décrire les techniques et lignes que nous utilisons pour l'imagerie, la quantification et la détermination de l'état chimique des métaux présents dans des échantillons biologiques. Pour pouvoir approfondir le rôle qu'ont ces métaux dans des processus biologiques comme les maladies neurodégénératives, ou pour connaître leur neurotoxicité, il est vital de déterminer les protéines avec lesquelles ces métaux interagissent, ou les organites subcellulaires dans lesquels ils s'accumulent. En général, les métaux vont être associés à des protéines de transport (des protéines qui leur permettent d'entrer dans la cellule) ou à des protéines de stockage (des protéines auxquelles ils sont liés une fois entrés dans les cellules en attendant d'être utilisés). Certains métaux sont essentiels à la vie et nécessaires pour le métabolisme cellulaire, donc la cellule va les capter en concentration contrôlée pour accomplir leur mission. Par contre, l'excès ou le déficit de ces métaux peuvent entraîner des conséquences pour le métabolisme cellulaire. D'autres éléments chimiques peuvent se substituer aux métaux essentiels au moment d'entrer dans la cellule et, en conséquence, perturber leur fonctionnement. Ainsi, notre intérêt est d'imager la localisation des protéines et métaux à l'intérieur cellulaire et de déterminer si la perturbation de l'un d'entre eux a de conséquences sur l'autre.

Les protéines d'intérêt peuvent être marquées par différents moyens et observées de différentes façons. Il faut savoir que la méthode de marquage est liée à la méthode d'observation et vice-versa. Ici, j'ai structuré cette section selon la méthode d'observation, en lumière transmise ou en mode fluorescence.

4.1 Lumière transmise

Dans le cas où l'observation se fait avec un microscope optique en lumière transmise, l'échantillon est souvent coloré pour rendre visible certaines caractéristiques d'intérêt. Les différentes techniques utilisées pour colorer un échantillon sont collectivement dénommées des techniques d'histochimie. L'histochimie consiste à colorer un échantillon biologique en fonction de son histologie. Le plus souvent ce sont des tissus qui vont être marqués pour révéler des caractéristiques morphologiques. Ainsi l'échantillon est exposé à des composés chimiques qui vont réagir et améliorer le contraste du tissu, et qui vont le colorer en fonction des caractéristiques des tissus et des structures microscopiques des cellules (Alturkistani 2016).

Les échantillons peuvent être colorés en utilisant un simple colorant, par exemple l'hématoxyline qui colore les noyaux en leur donnant une couleur bleu/violet ; l'éosine qui colore le cytoplasme en rose, etc. Ce type de marquage est couramment utilisé dans le diagnostic médical des tumeurs pour localiser les cellules malades ou tumorales ou d'autres cellules pathologiques (Musumeci 2014). Nous avons utilisé ce type de marquage pour identifier la nature cancéreuse du tissu dans l'étude de la distribution de nanoparticules de gadolinium (partie B, section 2.4).

Les techniques d'immunohistochimie sont aussi très utilisées pour révéler la localisation des protéines dans les tissus. Dans ce cas, les échantillons sont exposés à un anticorps qui se fixe de manière spécifique aux protéines pour lesquelles il a une affinité. Après quoi, la présence de cet anticorps, et donc la présence de la protéine d'intérêt, est révélée par coloration chimique et visible en utilisant un microscope optique en lumière transmise. C'est ce type de marquage que nous avons utilisé pour mettre en évidence de manière spécifique certaines régions du cerveau qui contiennent la protéine tyrosine-hydroxylase (je développerai cette application dans la partie B section 7).

Nombreux sont les protocoles et les produits chimiques disponibles pour la coloration histologique. Ces techniques font généralement appel à la fixation chimique (voir partie B section 5) et à des processus de lavage qui perturbent le contenu des éléments à l'intérieur des cellules et des tissus. Ce qui fait que l'utilisation de ces méthodes de marquage n'est pas toujours compatible avec nos techniques d'analyse. Une façon de les rendre compatibles est l'analyse des coupes adjacentes non colorées (voir section 6). Ce qu'il faut retenir pour tous ces types de marquage qui vont être révélés par coloration et lumière visible est qu'ils vont être faits sur des échantillons équivalents, adjacents, mais pas dans les mêmes échantillons, ils vont être analysés par les techniques de fluorescence des rayons X.

Le plus important dans nos travaux est la façon dont nous allons effectuer l'imagerie corrélative, la procédure à suivre avant le marquage histologique que j'expliquerai dans la section 6. En ce qui concerne le marquage, il faut simplement savoir qu'il existe des protocoles standardisés en fonction des caractéristiques que nous voulons révéler dans les tissus.

4.2 Microscopie à fluorescence

La fluorescence est un processus de photoluminescence dans lequel des atomes ou des molécules sont excités par l'absorption de radiations électromagnétiques. Les molécules qui ont été excitées se stabilisent ensuite pour revenir à l'état de base, en libérant l'excès d'énergie sous forme de photons. Pour mesurer cette propriété, l'échantillon est excité à la longueur d'onde d'absorption ou d'excitation, et l'émission est mesurée à une longueur d'onde plus grande, appelée longueur d'onde de fluorescence ou d'émission. Les organites ou protéines devront donc au préalable être marqués de manière spécifique avec des fluorochromes. Un fluorochrome est une molécule qui, excitée à une certaine longueur d'onde, va pouvoir émettre de la lumière à une longueur d'onde supérieure. Le décalage entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission confère au fluorochrome ses propriétés.

Aujourd'hui il existe de nombreuses protéines fluorescentes, des protéines couplées à un fluorochrome émetteur de fluorescence à certaines longueurs d'onde précises. L'utilisation de ces fluorochromes et le couplage avec les protéines d'intérêt sont un procédé assez commun et routinier pour imager les protéines à l'intérieur des cellules. Il existe deux méthodes pour marquer et détecter les protéines : une directe ou une indirecte. Dans la première, nous introduisons dans les cellules la protéine d'intérêt directement fixée à un fluorochrome (ou nous la faisons synthétiser par la cellule) et nous imageons la fluorescence de ce dernier et donc la localisation de la protéine souhaitée. La méthode indirecte consiste à introduire dans les cellules une molécule qui se fixe aux protéines d'intérêt, ensuite seulement est introduit un fluorochrome qui reconnaît cette molécule et donc nous détectons la fluorescence émise par le fluorochrome qui est fixé à la molécule, laquelle est attachée à la protéine d'intérêt.

En revanche, il faut rendre compatible le marquage des protéines et l'analyse par SXRF, c'est-à-dire qu'il faut utiliser des techniques de marquage qui ne perturbent pas la composition chimique. Pour ce fait, nous avons choisi de faire de la microscopie à fluorescence sur cellule vivante, en utilisant la méthode directe. Je parlerai aussi brièvement de l'utilisation des anticorps fluorescents, parce que même si ce type de marquage demande une fixation chimique il peut être utile dans certains cas en analysant des échantillons équivalents.

Nous avons longtemps utilisé la microscopie en épifluorescence qui est disponible dans notre équipe et facile à mettre en œuvre mais présente des limites de résolution spatiale. Pour avoir des images de fluorescence avec des résolutions spatiales de l'ordre atteint dans le synchrotron, nous avons adapté l'utilisation des techniques dites de super résolution ; concrètement la microscopie STED qui peut atteindre jusqu'à 40 nm. Par la suite je vais décrire ces deux techniques utilisées et les compromis faits pour les rendre compatibles avec l'analyse par SXRF.

a. La microscopie à épifluorescence

Dans un microscope à épifluorescence, un faisceau de lumière à spectre complet est émis par une lampe à mercure, plus récemment par des LED. Ce faisceau traverse ce qu'on appelle un « cube », c'est-à-dire un ensemble de miroirs dichroïques et de filtres d'excitation et d'absorption, qui va permettre de sélectionner la longueur d'onde de la lumière incidente. En fonction du filtre d'excitation, il est possible de choisir la longueur d'onde de la lumière qui va traverser l'objectif et arriver à l'échantillon. En choisissant une longueur d'onde incidente qui excite les fluorochromes de l'échantillon, les molécules fluorescentes sont excitées et émettent en réponse une lumière d'une longueur d'onde bien spécifique. Ces photons sont émis dans toutes les directions, et seule une fraction sera collectée par l'objectif. Cette lumière émise par l'échantillon traverse à nouveau le « cube », elle est filtrée en fonction des filtres d'absorption et elle est envoyée vers le port de la caméra située au-dessus. En filtrant complètement la lumière d'excitation sans bloquer la fluorescence émise, il est possible de voir uniquement les objets qui sont fluorescents (Coling 1997 ; Lichtman 2005).

Nous avons principalement fait usage de deux protéines fluorescentes, GFP (green fluorescent protein) et RFP (red fluorescent protein), couplées avec les organites cellulaires d'intérêt. Ces types de constructions fluorescentes vont servir à marquer une organelle de manière spécifique et sont fabriqués commercialement. Ainsi, si la protéine d'intérêt est liée avec la GFP nous devrions exciter l'échantillon avec de la lumière bleue et nous détecterions la distribution de la protéine en mesurant l'émission dans le vert. Si la protéine d'intérêt est liée avec la RFP (rouge) nous devrions exciter l'échantillon avec de la lumière le verte et mesurer dans le rouge (figure 4B.1). Aujourd'hui Thermofisher commercialise, sous le nom de CellLight™ reagents, de nombreux marqueurs fluorescents des organelles ou des protéines (<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cell-analysis/cell-structure/celllight-ready-to-use-fluorescent-protein-based-reagents.html>). Ils utilisent une technologie nommée BacMam, fondée sur l'utilisation de virus d'insectes (*baculovirus*) pour transmettre l'information génétique de transcription et l'expression vers le noyau cellulaire. L'expression du gène, donc de la protéine fluorescente, commence dans les 4 à 6 heures après la transduction. La microscopie à fluorescence utilisant ce type de marquage est réalisée sur cellule vivante et elle ne modifie ni la composition chimique ni la structure.

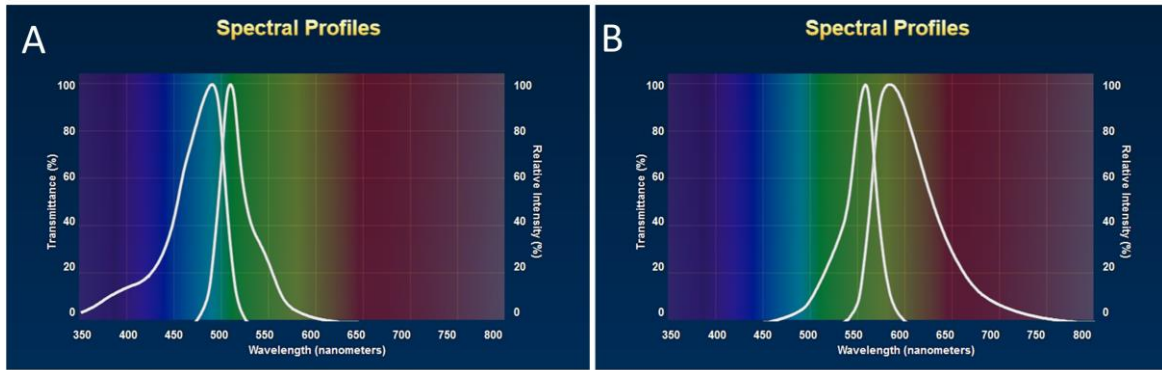


Figure 4B.1. Spectres d'absorption et d'émission (A) pour la protéine fluorescente EGFP (B) pour la protéine TagRFP, les deux vendues par ThermoFisher pour le marquage des organelles CellLight™. (<https://www.olympus-lifescience.com>)

En plus des protéines fluorescentes mentionnées nous avons utilisé un marquage fluorescent du noyau cellulaire, avec le Hoechst 33342. Ce composé est un colorant de l'ADN qui doit être excité par la lumière ultraviolette et qui émet dans le bleu. Ce marqueur est une petite molécule, très peu toxique, qui se fixe au niveau de l'ADN dans les cellules vivantes et donc n'induit pas de modifications chimiques des éléments. Cette molécule garde ses propriétés de fluorescence même après la lyophilisation, caractéristique qui n'est pas la même pour le marquage de type GFP, comme nous pouvons l'observer sur la figure 4B.2. Pour cette raison la microscopie à épifluorescence est réalisée sur cellule vivante et non après lyophilisation.

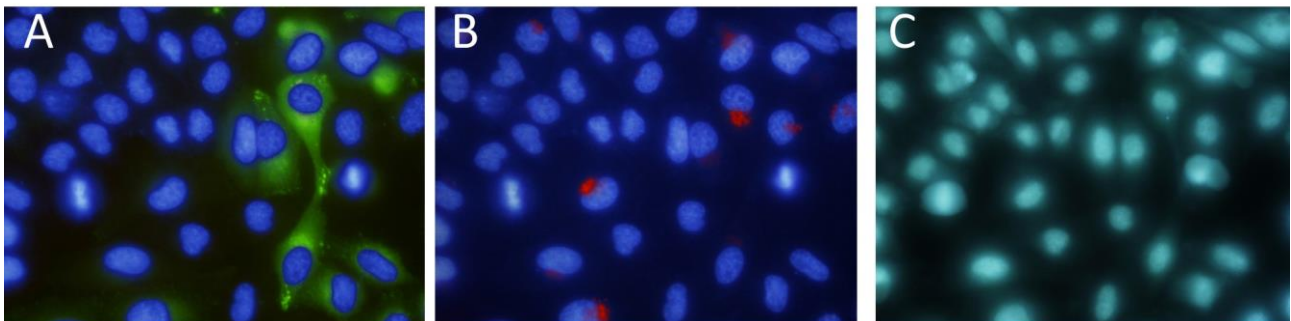


Figure 4B.2. (A, B) Fluorescence sur cellule vivante de la protéine Rab (GFP), de l'appareil de Golgi (RFP) et du noyau (bleu) ; (C) fluorescence du noyau après cryofixation et lyophilisation dans la même zone. Les fluorescences GFP et RFP sont éteintes après lyophilisation.

La technique d'immunofluorescence consiste à introduire un anticorps de synthèse dans la cellule de façon qu'il se fixe à la protéine d'intérêt. Il existe deux options de détection en fluorescence, ou bien cet anticorps est lié directement à un fluorochrome ou bien il faut introduire un autre anticorps fluorescent qui s'agrippe au premier de manière spécifique. Ces anticorps, couplés avec la GFP ou des protéines fluorescentes équivalentes, sont commercialisés et il existe un grand choix pour marquer toutes sortes de protéines, aussi bien dans des tissus que dans des cellules. Le problème est que, pour les faire entrer dans les cellules, le protocole demande une fixation chimique et la perméabilisation des membranes cellulaires. Tout comme le marquage histologique, l'immunofluorescence n'est pas vraiment compatible avec nos techniques, mais

nous pouvons utiliser ce type de marquage sur des coupes adjacentes ou des cellules équivalentes. Je montre dans la partie B section 7 un exemple d'application de l'immunofluorescence sur cellules et comment cela peut nous aider à comprendre des mécanismes pathologiques. Mais il faut garder en tête que si nous utilisons des protocoles qui modifient le contenu élémentaire, nous ne pouvons pas analyser le même échantillon par microscopie photonique ou microscopie par rayons X.

b. La microscopie à super résolution STED

La lumière, comme toute onde électromagnétique lorsqu'elle rencontre un objet, a la propriété de diffracter. En microscopie, l'image d'un point n'est pas un point mais une tache de diffraction appelée disque d'Airy. Cette diffraction va induire une limite dans la capacité d'un système à reproduire distinctement deux points objets. Cette limite est appelée la résolution du microscope. Donc un microscope peut reproduire l'image de deux points distants seulement s'ils sont séparés par une distance supérieure ou égale à la résolution du système, qui peut être définie grâce à la formule d'Abbe et le critère de Rayleigh comme :

$$d = \frac{0.61 \cdot \lambda}{ON}$$

où d correspond à la plus petite distance pouvant être résolue, λ la longueur d'onde d'émission de la lumière et ON correspond à l'ouverture numérique du microscope (*NA, Numerical Aperture* en anglais). Alors l'ouverture numérique se calcule selon : $ON = n \cdot \sin\alpha$, avec n = indice de réfraction du milieu et α la moitié de l'angle d'ouverture de l'objectif du microscope. Ainsi pour un microscope qui utilise le spectre de la lumière visible (400 à 700 nm) et pour des observations faites dans l'air (indice de réfraction 1), la résolution spatiale limite est d'environ 200 nm. Si nous nous intéressons, par exemple, aux compartiments synaptiques qui mesurent en moyenne 1 μm et aux vésicules qui se trouvent à l'intérieur, une résolution de 200 nm ne permettra pas d'étudier les neurones à l'échelle des compartiments subsynaptiques. Si nous voulons descendre la limite de résolution spatiale photonique nous devons faire usage d'autres techniques dites super-résolutives.

En 2014, le prix Nobel de chimie a été attribué à Eric Betzig, Stefan Hell et William Moerner pour avoir développé les techniques de microscopie dites super-résolutives. Ces techniques permettent de descendre la limite de résolution en dessous de la limite imposée par la diffraction de la lumière (Hell 1994). L'une de ces microscopies à résolution, PALM (*Photo Activated Localization Microscopy*), est fondée sur la détection de la molécule unique (Betzig 2006). Le principe est d'activer les molécules fluorescentes tour à tour, de manière aléatoire, rapide et répétitive. Le concept de résolution est remplacé par celui de localisation de source unique, c'est par comparaison de toutes les images aléatoires de fluorescence que la localisation précise de chaque molécule unique sera obtenue. Je parlerai de cette technique dans mon projet de recherche, partie C.

Une autre technique est la microscopie STED, déplétion par émission stimulée (Hell 2004), c'est celle que nous avons mise en œuvre dans nos recherches (Domart 2019 ; Domart 2020). Elle permet d'obtenir une résolution latérale de l'ordre de 30 à 80 nm en diminuant directement la taille du point focal de fluorescence. Cette technique est fondée sur le principe de l'émission stimulée ; en plus du laser d'excitation, elle met en jeu un laser de déplétion en forme de tore qui va « éteindre » la fluorescence périphérique du point focal pour ne garder que la fluorescence de cœur. Il n'y aura pas d'émission de fluorescence isotropique autour

du point d'excitation et la tache de diffraction devient alors plus petite, ce qui permet d'augmenter considérablement la résolution, figure 4B.3 (Hell 2004 ; Nägerl 2008).

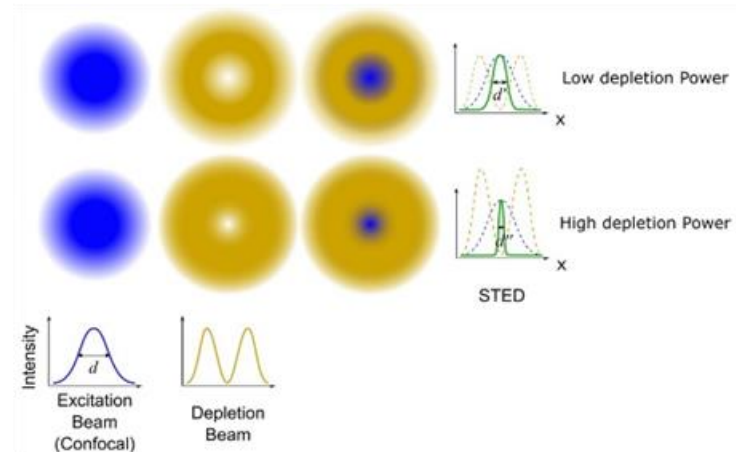


Figure 4B.3. Schéma du principe de la microscopie STED. Images des points d'excitation (bleu) et de déplétion (jaune) ainsi que la superposition des deux montrant l'annulation de la fluorescence périphérique pour ne garder que la fluorescence au centre de l'excitation. Lorsque la puissance du laser de déplétion est élevée, la résolution spatiale augmente (Adapté de Tam 2015).

Nous nous sommes tournés vers des fluorochromes basés sur la « silicone rhodamine » (SiR) très stables et développés pour la microscopie STED : la SiR650 (communément appelée SiR) et la SiR700 (Lukinavičius 2014 ; Lukinavičius 2016) (Spirochrome). Ces fluorochromes, très brillants et très résistants au photoblanchiment fluorescent dans le rouge lointain, sont compatibles avec la microscopie sur cellule vivante. La membrane plasmique étant perméable à ce type de fluorochrome, leur utilisation ne nécessite pas d'électroporer ou de transfecter les cellules, et l'expression de la protéine ciblée reste endogène. Les cellules vivantes peuvent donc être marquées juste avant d'être cryofixées avec le seul ajout de ces fluorochromes dans le milieu de culture et sans suivre aucun procédé chimique.

Pour la microscopie photonique super-résolutive sur cellules vivantes, des lamelles de verre (sur lesquelles poussent les cellules) sont montées dans une chambre de type « Ludin » dans laquelle du milieu d'observation est ajouté. Nous avons dû adapter ce dispositif par rapport à nos supports de culture, les fenêtres de nitrure de silicium Si_3N_4 . Nous avons disposé la face présentant les cellules contre la lamelle de verre, et en présence de milieu d'observation, en évitant la formation de bulles d'air. Le milieu d'observation a deux fonctions, la première de maintenir les cellules en vie pendant les observations et la deuxième de diminuer l'autofluorescence et donc de diminuer le bruit sur les images de fluorescence. Nous nous sommes tournés vers le Tyrode que nous avons préparé en conditions stériles et qui a été équilibré avant utilisation. Il est composé de 135 mM de chlorure de sodium, 5 mM de chlorure de potassium, 1,8 mM de chlorure de calcium, 0,4 mM de chlorure de magnésium, 1 mM de glucose et 1 mM d'HEPES, le tout dilué dans de l'eau ultra-pure, le pH et l'osmolarité sont ajustés à celle du milieu de culture des neurones.

Nous avons cherché à vérifier si la microscopie STED était réalisable sur des échantillons lyophilisés. Nous avons constaté que la lyophilisation induit une perte importante de fluorescence et donc une perte importante de signal. Pour pouvoir imager les échantillons, il est nécessaire de baisser la puissance du laser de déplétion et cela a une répercussion dramatique sur la résolution de l'image en STED, qui devient alors

comparable à la résolution obtenue par les techniques classiques de fluorescence. Sur figure 4B.4, la perte de signal de fluorescence après la lyophilisation est visible. C'est pour cette raison que la microscopie STED se réalise sur cellule vivante et pas sur des échantillons lyophilisés qui ont suivi tout le processus de préparation des échantillons (voir partie B, section 5).

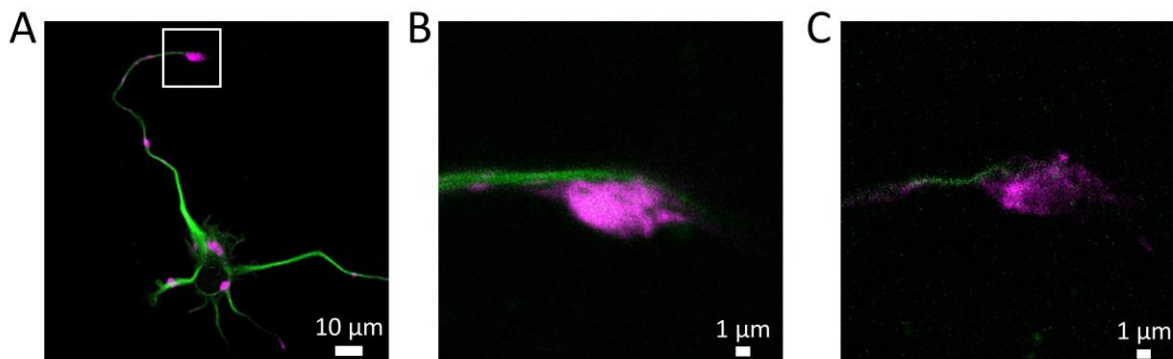


Figure 4B.4. Distribution de la tubuline (en vert) et de la F-actine (en magenta) dans les cônes de croissance des neurones de l'hippocampe. (A) Image confocale dans un neurone vivant DIV3. (B) image STED dans le cône de croissance marqué en A sur neurone vivant. (C) Image STED de la même région B après cryofixation et lyophilisation.

5. Préparation des échantillons

Quelle que soit la méthode d'analyse, la qualité du résultat est toujours dépendante de la qualité de la préparation des échantillons. Tout au long de mon parcours de recherche en chimie analytique, j'ai porté un soin tout particulier à l'élaboration, au perfectionnement et à la validation des protocoles de préparation des échantillons biologiques pour l'imagerie et la spéciation des éléments.

Nous utilisons des techniques d'analyse d'émission de rayons X, induite par des particules (PIXE) ou rayons X (SXRF), pour déterminer la distribution et le contenu des éléments qui constituent nos échantillons biologiques, coupes de tissus, ou cellules isolées. Ces techniques spectrométriques ne peuvent pas être réalisées directement sur des cellules vivantes en raison des dommages subis par l'échantillon, particulièrement par la radiolyse de l'eau sous l'effet du rayonnement. Les analyses sont nécessairement conduites sur des échantillons déshydratés ou sur des échantillons hydratés maintenus à très basse température.

La préparation des échantillons est une question critique, car ces techniques analytiques présentent des seuils de détection très bas et de très hautes résolutions spatiales. Les protocoles invasifs de préparation des échantillons généralement utilisés en imagerie biologique peuvent induire une contamination et/ou une redistribution des éléments au niveau cellulaire (Chwiej 2005 ; Hackett 2011 ; Al Ebraheem 2015 ; Perrin 2015). Par conséquent, nos techniques nécessitent donc des méthodes de préparation spécifiques pour répondre à ces besoins. Concrètement le protocole de préparation des échantillons doit répondre à trois critères : 1) préserver la structure cellulaire ; 2) ne pas altérer la répartition des éléments chimiques, en particulier des ions diffusibles et 3) éviter l'introduction d'éléments chimiques exogènes, de contaminants. Les méthodes cryogéniques sont la meilleure option pour ce type de préparation puisqu'elles consistent à immobiliser rapidement l'échantillon par cryofixation et donc à figer les structures cellulaires et les

distributions élémentaires à un instant donné. Donc la cryofixation garantit les trois critères demandés par l'imagerie quantitative par émission de rayons X : 1) préservation de la structure 2) conservation de la composition élémentaire et 3) pas d'apport d'éléments externes. Par exemple, en microscopie électronique la cryofixation est la seule méthode alternative à la fixation chimique utilisée conventionnellement pour la préparation des échantillons.

Cependant, les techniques de marquage utilisant la fixation chimique peuvent s'avérer d'une grande utilité pour l'analyse corrélative sur des échantillons adjacents ou pour l'analyse de la distribution sur des cellules équivalentes, mais provenant d'échantillons différents. Dans la section 6, partie B, je vais illustrer comment, dans certains cas, nous pouvons réaliser l'imagerie corrélative en utilisant la fixation chimique.

5.1 La culture cellulaire

Dans le cas de cultures secondaires de lignées cellulaires ou de cultures primaires de neurones dissociés, les cellules sont cultivées directement sur des supports spécifiques pour l'analyse par spectrométrie de fluorescence des rayons X. Ces techniques de fluorescence des rayons X ont des exigences spécifiques par rapport aux supports d'analyse : 1) les supports doivent être exempts de toute trace d'éléments chimiques susceptibles d'être dans les échantillons d'intérêt ou des produits toxiques ; 2) ils doivent être suffisamment fins pour permettre au faisceau incident de les traverser sans interagir avec eux et donc sans augmenter la radiation de freinage ou *bremsstrahlung* pour les faisceaux d'ions (ce que diminuerait la sensibilité) ; 3) ils doivent être plats pour avoir le même angle d'incidence entre faisceau et échantillon pour toute la cible et pouvoir faire la détection de rayons X émis à l'angle souhaité.

Il existe deux types de supports, les films de polycarbonate posés sur des supports en PEEK (polyétheréthercétone) et les membranes de nitrure de silicium Si_3N_4 (Colvin 2016 ; Perrin 2015, 2017). Les supports 'PEEK' se composent d'un rectangle fait avec un plastique ultra-pur nommé PEEK avec au milieu un trou carré de 5 mm de côté et l'ensemble est recouvert d'une feuille de polycarbonate ultra-pur de 2 μm d'épaisseur (figure 5B.1). Les supports de nitrure de silicium Si_3N_4 se composent d'un cadre de silicium de 5 mm de côté et 200 μm d'épaisseur au centre duquel se trouve la membrane de Si_3N_4 , également carrée, mesurant 1,5 mm de côté et présentant une épaisseur de 200 nm ou 500 nm (figure 5B.1). Une petite membrane carrée (de 100 μm de côté) est usinée près d'un des quatre coins du cadre de silicium afin de faciliter l'orientation du support et le calcul des positions des zones d'intérêt. Ces supports présentent par rapport aux supports 'PEEK' des propriétés optiques compatibles avec la microscopie photonique super-résolutive STED (Domart 2019) et sont les seuls supports compatibles avec la ligne ID16A de l'ESRF.

Pour rendre ces supports compatibles avec la culture cellulaire, ils sont stérilisés par immersion dans de l'éthanol ultra-pur pendant 2 heures, séchés sous une hotte à flux laminaire et traités pour que les cellules ou neurones y adhèrent. Dans le cas des cellules, les supports étaient traités, quelques jours auparavant, avec du gel de gélatine pendant 15 minutes, après quoi ils sont rincés à l'eau ultra-pure trois fois et séchés sous la hotte à flux laminaire pendant une demi-journée. Les neurones primaires sont beaucoup plus sensibles aux conditions de culture, nous avons opté pour l'utilisation d'un protocole d'adhésion similaire à celui des lamelles de verre. Les supports sont donc recouverts avec de la poly-lysine (à 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) pendant 2 heures 30 minutes à 37 °C, ils sont rincés deux fois avec de l'eau ultra-pure et gardés dans l'incubateur en présence d'un milieu.

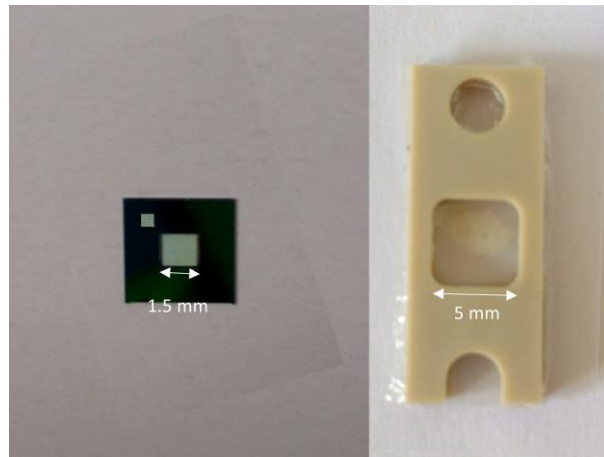


Figure 5B.1. À gauche une membrane de nitrure de silicium, à droite un support 'PEEK' couvert d'un film de polycarbonate.

Les neurones primaires sont ensemencés sur les membranes de Si_3N_4 à une densité homogène d'environ 30 000 à 50 000 cellules par centimètre carré et ils sont incubés pendant 2 heures avec du milieu (temps suffisant pour qu'ils adhèrent à la membrane). Ensuite, les membranes sont déposées (neurones vers le haut) dans une boîte de Pétri présentant une couche de cellules gliales (astrocytes). Ces cellules gliales ont été ensemencées dans la boîte de Pétri 15 jours avant les neurones, elles sont nécessaires au développement et à la survie des neurones (Kaech 2006). Au 4^e jour *in vitro* ou DIV4 (*Day in vitro* 4) les cultures sont traitées avec de la cytosine arabinoside à 2 μM pour freiner la prolifération des cellules gliales et permettre ainsi de sélectionner la population de neurones. Entre DIV15 et DIV21, le réseau dendritique et les épines des neurones sont bien développés. Les cellules sont ensemencées sur les membranes Si_3N_4 ou les supports PEEK, à basse densité soit 10 000 cellules par centimètre carré, le jour avant le début des expositions ou transfections. Les supports sont déposés dans des boîtes de Pétri, avec un couvercle permettant de les fermer et les garder en conditions stériles, ils sont maintenus dans l'incubateur à 37 °C, dans une atmosphère avec 5 % de CO_2 . Dans le cas où le marquage de protéines nécessite l'utilisation de la fixation chimique, alors ces cellules ou neurones ne seront pas analysés par nos techniques de fluorescence des rayons X. Ainsi ces cellules ou neurones ne nécessitent pas d'être cultivés directement dans nos supports spécifiques et ils peuvent être cultivés sur des supports classiques comme les lamelles de verre.

5.2 Fixation chimique

La fixation chimique consiste à figer de manière irréversible la structure des échantillons (cellules ou tissus) de façon à rendre insolubles les composants cellulaires en formant des liaisons covalentes entre les protéines. Cependant, ce processus, couramment réalisé au moyen de fixateurs à base d'aldéhydes, comme le formol neutre tamponné (NBF), paraffine-formaline (paraformaldéhyde – PFA) ou glutaraldéhyde détruit et dénature les protéines, ce qui les rend dysfonctionnelles (Kiernan 2000 ; Alturkistani 2016).

Le processus de fixation chimique comporte aussi d'autres étapes comme la déshydratation, la perméabilisation et le rinçage. La première consiste à enlever l'eau des échantillons par déshydratation avec de l'éthanol. L'étape de perméabilisation est notamment utilisée par le marquage avec des anticorps. Elle

consiste à perméabiliser les membranes cellulaires, à l'aide de détergents comme le Triton X-100 ou le Tween 20, pour faire entrer les anticorps et leur permettre de se fixer aux protéines pour lesquelles ils sont spécifiques. Les étapes de rinçage ont lieu tout au long du processus de fixation avec l'objectif d'enlever toute liaison aspécifique. Une fois l'échantillon fixé, il est possible de révéler les zones histologiques d'intérêt par différents moyens. Par exemple, il est possible d'utiliser des produits chimiques, comme l'hématoxylin-eosin (H&E), pour marquer certaines parties ou caractéristiques des tissus (les noyaux des cellules) au moyen de la microscopie par lumière visible. Ou encore, il est possible d'utiliser des anticorps et révéler la localisation des protéines d'intérêt par différentes méthodes comme l'immunofluorescence ou immunohistochimie.

Nous avons démontré (Davies 2014; Roudeau 2014 ; Perrin 2015), ainsi que d'autres collègues (Chwiej 2005 ; Ralle 2009; Matsuyama 2010 ; James 2011 ; Hackett 2011 ; Robison 2012 ; Al-Ebraheem 2015 ; Jin 2017), que la fixation des cellules au moyen d'aldéhydes et détergents cause des modifications des éléments chimiques. Notamment la perte des éléments les plus légers et les ions les plus mobiles. La figure 5B.2 illustre deux spectres PIXE obtenus après cryofixation et *freeze-drying* (bleu) ou après fixation chimique (rouge). Nous pouvons constater que la fixation chimique induit des changements dans la concentration des éléments, notamment la perte du potassium, du chlore, du cuivre et du zinc. Donc la fixation chimique n'est pas un protocole optimal pour l'étude des éléments intra cellulaires, la cryofixation préserve mieux les pools intracellulaires des éléments chimiques, et donc nos techniques spectroscopiques par fluorescence des rayons X ne sont pas compatibles avec la fixation chimique.

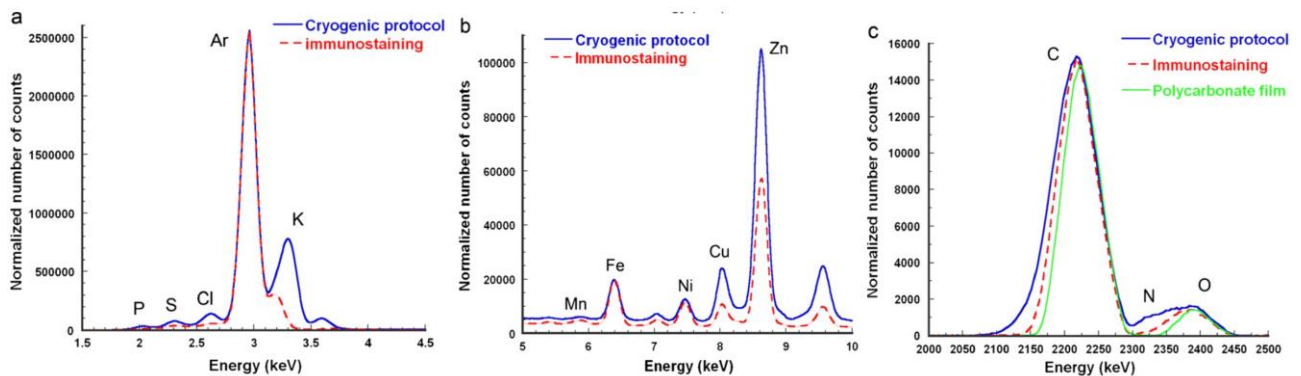


Figure 5B.2. a, b) Comparaison de la composition chimique élémentaire des cellules, pour deux types de préparations : fixation chimique (rouge) et cryofixation et freeze-drying (bleu). La fixation chimique induit une perte drastique des éléments diffusibles K, Cl mais aussi du Cu, du Zn, du carbone et de l'azote. La cryofixation préserve mieux les pools cellulaires des éléments chimiques (Roudeau 2014).

5.3 Méthodes cryogéniques

Pour la préparation d'échantillons, nous avons développé une méthode à plusieurs étapes, selon les besoins : 1) rinçage du milieu extracellulaire ; 2) cryofixation par immersion dans un fluide cryogénique ; 3) lyophilisation ou déshydratation sous vide et à basse température. Nous verrons, ci-après, pour chaque étape la procédure à suivre et les spécificités en fonction du type d'échantillons à préparer et les besoins analytiques.

Nous travaillons sur deux types d'échantillons biologiques : les tissus (à partir de coupes fines) et les cellules isolées. Dans le cas des tissus, en général, le bloc en entier est cryofixé par immersion, après (comme nous verrons dans la partie 6) des sections de la zone d'intérêt sont faites avec un cryomicrotome et puis ces sections sont lyophilisées. Pour l'analyse cellulaire, le protocole de préparation d'échantillons est plus complexe et détaillé ci-dessous.

a. Le rinçage du milieu de culture

Les cellules et les neurones sont toujours immergés dans du milieu de culture tant qu'ils sont vivants. Ce milieu apporte les nutriments nécessaires pour le développement cellulaire (acides aminés, vitamines, glucose...), il est riche en sels minéraux, comme le Na, Cl, K ou Ca, et contient aussi d'autres éléments chimiques nécessaires pour la bonne croissance cellulaire (notamment les métaux essentiels Fe, Cu, Zn, etc.). De même, pour l'observation des protéines fluorescentes sur cellule vivante, elles sont maintenues immergées dans du milieu d'observation, comme le Tyrode.

Les éléments en forte quantité dans le milieu extracellulaire comme le Na, Cl, K, Ca peuvent provoquer une très forte émission de fluorescence X qui peut saturer le signal détecté par rapport à celui des éléments traces intracellulaires, et donc ils camoufleraient le signal provenant des cellules. Il est donc crucial d'éliminer ces éléments extracellulaires avant la cryofixation. De plus, il est important d'éliminer les restes de protéines, vitamines ou oligo-éléments qui sont présents en petites quantités dans le milieu pour pas confondre cette contribution extérieure avec la composition intérieure de cellules. Pour ces raisons les échantillons sont donc rincés avant cryofixation dans une solution qui permet d'éliminer tous les composants du milieu de culture et d'observation et, en même temps, cette solution doit éviter un quelconque choc osmotique.

Pour les cultures secondaires de lignées cellulaires, le rinçage se faisait initialement en deux étapes. Premièrement les cellules étaient immergées dans une solution de PBS (solution saline tamponnée au polyphosphate) de pH et d'osmolarité similaires au milieu de culture. Par ce rinçage rapide (< 20 secondes), l'objectif était d'éliminer le milieu extracellulaire. Un second rinçage était alors effectué avec de l'eau de haute pureté qui permettait d'éliminer les ions extracellulaires présents en grande quantité dans le PBS (par exemple Na et Cl). Le second rinçage devait être plus rapide, quelques secondes seulement, de sorte que la modification de la pression osmotique n'affecte pas la structure cellulaire avant la cryofixation. Après le second lavage, l'excès d'eau était éliminé avec du papier absorbant et l'échantillon rapidement cryofixé. Ce protocole était satisfaisant pour l'étude de cellules relativement résistantes au choc osmotique telles que les cellules tumorales (Carmona 2008 a).

Même si le rinçage est effectué sur un temps court avant la cryofixation, la solution de rinçage doit préserver la viabilité et la morphologie cellulaire en évitant un choc osmotique. L'eau distillée et le PBS sont des milieux hypotoniques par rapport au milieu de culture et il est connu que la morphologie des neurones primaires d'hippocampe varie rapidement dans ce type de milieu (Aitken 1998). De fait et dans le but d'avoir un protocole de préparation généralisé qui évite tout choc osmotique et qui puisse être utilisé avec n'importe quel type de culture de neurones ou de lignes cellulaires, nous avons testé différentes solutions de rinçage. Notre objectif était de comparer la composition élémentaire des cellules préparées selon différents protocoles inspirés de la littérature et de nos expériences (Matsuyama 2010 ; Dučić 2013 ; Dučić 2015). D'un côté, nous avons comparé l'utilisation comme solution de rinçage du couple PBS/eau et d'un autre côté l'utilisation d'une solution d'acétate d'ammonium. Nous avons préparé aussi des échantillons utilisant seulement le PBS et une technique de cryofixation différente, finalement nous avons comparé aussi ces types de préparations avec des échantillons fixés chimiquement en utilisant des conditions douces (PFA peu concentré et peu d'étapes de rinçage) (Perrin 2015).

Finalement, nous avons conclu que l'utilisation d'acétate d'ammonium comme solution de rinçage des éléments extracellulaires avant la cryofixation s'avérait être la meilleure option (Perrin 2015) puisqu'elle n'introduit pas de modifications des compositions élémentaires (figure 5B.3) et que la morphologie cellulaire est préservée. L'acétate d'ammonium, de formule $C_2H_7NO_2$, est un sel azoté comprenant uniquement des éléments légers qui ne perturbent pas les analyses spectroscopiques, car seuls les éléments de $Z > 11$ sont détectés. Cette solution tampon est préparée par dissolution dans de l'eau ultra-pure, et le pH et l'osmolarité sont ajustés à ceux du milieu de culture (dans notre cas avec la lignée PC12 pH = 7,4 et 310 mOsm). Enfin, la solution est stérilisée par filtration et équilibrée à 36,7 °C avant utilisation. Ainsi, depuis 2015, pour les neurones et pour toutes les lignées cellulaires, le rinçage se fait en une seule étape, avec de l'acétate d'ammonium d'osmolarité et pH ajustés à ceux du milieu de culture utilisé. Après le rinçage, l'excès de tampon est éliminé du support avec du papier absorbant et l'échantillon est rapidement cryofixé par immersion.

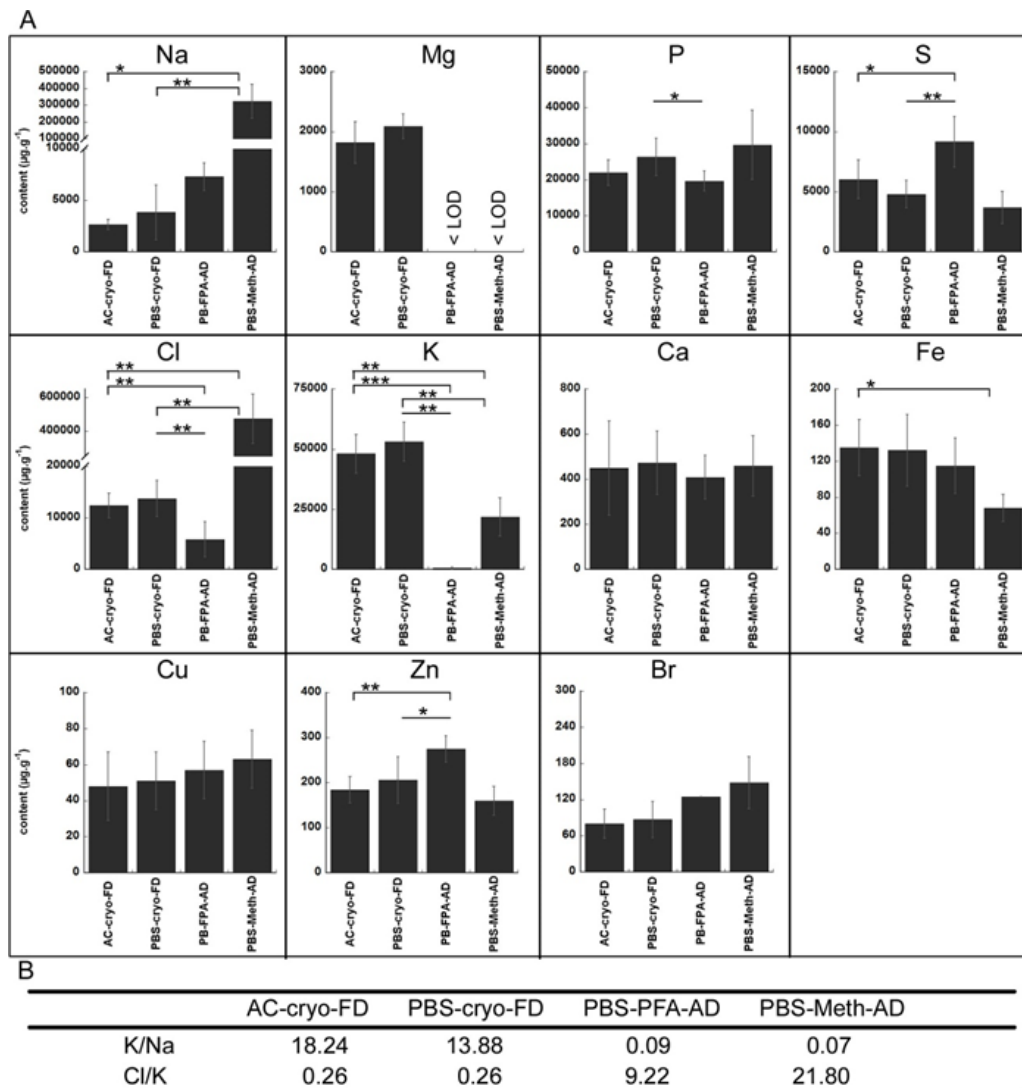


Figure 5B.3. Comparaison du contenu élémentaire dans des cellules PC12 mesuré par micro-PIXE selon quatre protocoles différents : AC+cryo+FD : rinçage à l'acétate d'ammonium, cryofixation et freeze-drying (FD) ; PBS+cryo+FD : rinçage au PBS et à l'eau ultra-pure, cryofixation et freeze-drying ; PBS+PFA+AD : rinçage au PBS, fixation chimique au paraformaldéhyde et séchage à l'air (AD) ; PBS+meth+AD : rinçage au PBS, cryofixation au méthanol refroidi et séchage à l'air (AD) (Perrin 2015).

b. La cryofixation (ou *plunge-freezing*)

La cryofixation est une méthode de congélation rapide de l'échantillon. Pendant la congélation, des cristaux de glace se forment dans les échantillons (processus appelé nucléation) et la taille de ces cristaux dépend inversement de la vitesse de congélation. La cryofixation peut donc induire des dommages aux structures cellulaires, surtout si la taille des cristaux est grande. Pour éviter cela et obtenir des cristaux de glace de petite taille, la vitesse de refroidissement de l'échantillon doit être la plus élevée possible (Quintana 1994 ; Elder 1989). Pour obtenir une baisse rapide de la température, l'échantillon est immergé dans un liquide cryogénique qui est refroidi à basse température. Les liquides cryogéniques sont des composés avec un grand écart entre la température de fusion et d'ébullition et qui ont une bonne conductivité thermique, comme le

2-méthylbutane, le propane ou l'éthane. Pour nos échantillons biologiques nous avons utilisé du 2-méthylbutane refroidi à -165 °C par contact avec de l'azote liquide.

Concrètement, après le rinçage, il est nécessaire d'enlever l'excès de liquide dans les échantillons pour éviter la formation d'une couche de glace épaisse autour de la cible. Cette couche de glace peut atténuer les rayons X légers émis par l'échantillon. Donc, délicatement avec du papier absorbant non tissé (Whatman®), la solution de rinçage est absorbée puis les échantillons sont plongés rapidement, et maintenus pendant quelques dizaines de seconde, dans du 2-méthylbutane refroidi à -165 °C . Une fois l'échantillon refroidi, il est maintenu dans des vapeurs d'azote et les traces du 2-méthylbutane sont absorbées avec du papier absorbant non tissé refroidi au préalable à la même température que l'échantillon. À ce stade nos échantillons sont cryofixés et peuvent être stockés dans des vapeurs d'azote liquide avant d'être analysés sous la forme congelée-hydratée lorsqu'un porte-échantillon cryogénique est installé sur les lignes de lumière ou bien ils peuvent être lyophilisés (*freeze-drying*) si les analyses sont menées à température ambiante.

Dans le cas des tissus biologiques, comme des tumeurs ou parties d'organes d'intérêt, le tissu est extrait et directement cryofixé par immersion dans un liquide cryogénique. Le temps d'immersion doit être plus long pour les tissus que pour les cellules puisque le volume à refroidir est plus considérable. Après la cryofixation, le bloc de tissu congelé est soit stocké à basse température soit directement transféré dans un cryomicrotome refroidi à -25 °C . Le tissu est monté avec du milieu de congélation et des cryosections sont préparées et déposées sur les supports d'analyse (polycarbonate/PEEK). Pour éviter la déformation des tissus, la cryosection est recouverte d'un second porte-échantillon en PEEK/polycarbonate. De cette manière, maintenues entre les deux supports, les sections sont dans une position stable pendant la manipulation et l'analyse, et elles peuvent être stockées en congelées-hydratées ou lyophilisées.

c. La lyophilisation (*freeze-drying*)

La lyophilisation que nous effectuons est appelée « *freeze-drying* », elle consiste à déshydrater l'échantillon sous vide et à très basse température. Les échantillons sont donc lyophilisés en conditions douces par sublimation de la glace en vapeur d'eau pour minimiser les effets de la déshydratation sur la structure cellulaire (Carmona 2008 a).

Nous avons deux types de lyophilisateurs : l'un de marque Christ modèle Alpha 1-2 LDplus et un second de marque Quorum modèle K775X. Dans le premier, de marque Christ, la température de lyophilisation est obtenue avec un condenseur et varie entre -50 et -80 °C en fonction du vide atteint. L'échantillon cryofixé est introduit dans le lyophilisateur, auparavant refroidi, et le vide est lancé rapidement. Le vide est réalisé au moyen d'une pompe à vide et atteint généralement $0,040\text{ mbar}$ ou moins. Les échantillons sont déshydratés à l'intérieur pendant deux à trois jours. Ensuite, nous laissons la température du condenseur remonter progressivement jusqu'à la température ambiante, enfin et doucement nous laissons entrer de l'air sec (l'air passe par des billes de gel de silice) jusqu'à atteindre la pression atmosphérique. À ce stade nous pouvons sortir les échantillons lyophilisés et les conserver à température ambiante dans un environnement sec jusqu'aux analyses.

Dans le second lyophilisateur, de marque Quorum, la température de lyophilisation (-120°C) est obtenue par contact thermique avec une plaque en cuivre refroidi avec de l'azote liquide. L'échantillon cryofixé est introduit dans le lyophilisateur précédemment refroidi et le vide est lancé rapidement. Les échantillons sont déshydratés pendant un jour, après quoi la température et la pression à l'intérieur sont remontées par paliers progressifs jusqu'à la température ambiante et la pression atmosphérique. Une fois la lyophilisation terminée, les échantillons peuvent être utilisés ou stockés dans un environnement sec et à température ambiante. Les deux lyophilisateurs donnent de bons résultats de préservation, avec le premier lyophilisateur nous pouvons préparer plus d'échantillons en même temps puisque sa surface est plus grande, il est donc plus adapté pour la lyophilisation des tissus et quand le nombre des cibles à lyophiliser est important.

6. Imagerie corrélative métaux-protéines

J'ai présenté les techniques d'analyse par fluorescence des rayons X induits par faisceau d'ions ou par rayonnement synchrotron que nous mettons en œuvre pour l'étude des métaux. J'ai présenté aussi les techniques de fluorescence des protéines pour la détermination de la distribution des organelles ou des protéines d'intérêt qui sont à notre disposition, et comment les rendre compatibles avec l'analyse des métaux, ainsi que la spécificité des méthodes cryogéniques de préparation des échantillons pour l'imagerie.

Par la suite j'expliquerai la procédure à suivre pour mener à terme l'imagerie corrélative. Premièrement, j'expliquerai les étapes et l'ordre dans lequel il faut les accomplir pour aboutir à l'imagerie corrélative sur des neurones ou cellules. Dans un deuxième temps, j'expliquerai comment nous procédons pour l'imagerie corrélative dans des tissus. Toujours avec le but de corréler la distribution des métaux mis en cause dans les processus de neurodégénérescence et la localisation des protéines qui régulent leur fonctionnement (entrée, transport, efflux, stockage...) ou des protéines qui agissent avec ou à cause d'eux.

6.1 Imagerie corrélative dans les cellules/neurones

Pour déterminer la distribution des métaux à l'intérieur des cellules et localiser les protéines ou organelles d'intérêt, nous avons développé un *workflow* sur la manière d'observer, préparer et analyser nos échantillons. En fonction de la ligne d'analyse et des besoins techniques, par exemple si nous travaillons à température ambiante ou si la résolution spatiale est nanométrique, nous devons suivre, ou non, le protocole dans son intégralité. Le processus est illustré sur l'image 6B.1. La première étape 1) consiste à cultiver les cellules ou neurones dans les supports d'analyse adéquats, en fonction des caractéristiques et contraintes de la ligne synchrotron. Pendant cette étape se réalisent, si nécessaire, les expositions aux métaux et/ou produits toxiques, molécules perturbatrices, etc. La deuxième étape 2) consiste à marquer et observer les protéines d'intérêt, *in vivo*. Au cours de cette phase, les cellules vivantes seront cultivées avec des protéines fluorescentes qui entreront dans les cellules sans induire de modifications chimiques. L'observation se réalisera, si possible, à 37°C et sous atmosphère de 5% de CO₂ ou (à défaut) en limitant le temps d'observation afin que les cellules souffrent le moins possible et ne meurent pas. Il est important à ce stade d'enregistrer les positions des cellules fluorescentes d'intérêt par rapport à un point de repère pour pouvoir les retrouver après la préparation d'échantillons. Nous avons utilisé l'épifluorescence ou la technique STED en fonction de nos objectifs de résolution spatiale. Si nous voulons sonder des petits volumes, comme l'intérieur d'une synapse, il faudra du STED, en revanche si nous sommes intéressés par des organelles plus

grandes, comme le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi, nous pouvons nous contenter de l'épifluorescence. La troisième étape sera 3) la préparation des échantillons par méthode cryogénique. Cette partie est divisée en deux phases, cryofixation et lyophilisation, cette dernière est optionnelle et son exécution dépendra si la ligne d'analyse est équipée d'un cryostat ou si les analyses se font à température ambiante. Dans le premier cas, après la cryofixation, les échantillons seront conservés dans des vapeurs d'azote jusqu'au moment des analyses. En revanche, les échantillons qui peuvent être lyophilisés se conservent à température ambiante. Dans ce cas, il convient, une fois les échantillons lyophilisés, d'observer les cellules en microscopie optique pour vérifier la préservation globale de la cellule et aussi pour déterminer la localisation du noyau par fluorescence. Les images des noyaux nous permettront par superposition avant/après de reconnaître les cellules qui montraient de la fluorescence *in vivo* (voir figure 6B.2). La quatrième partie 4) consiste à analyser les métaux par SXRF ou XAS. Grâce aux positions enregistrées à l'étape 2 nous pouvons retrouver les cellules montrant de la fluorescence *in vivo* et les analyser. Nous pouvons utiliser la technique XAS si l'échantillon est conservé en congelé-hydraté et la technique SXRF pour imager la distribution des métaux si les échantillons sont conservés en congelé-hydraté ou en lyophilisé.

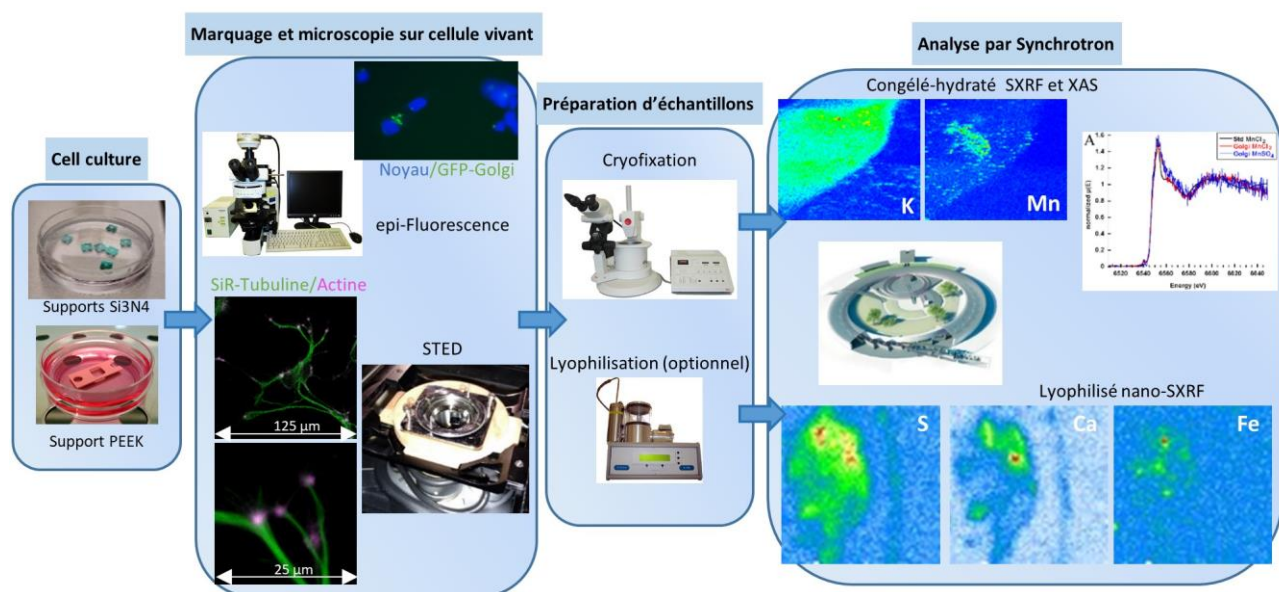


Figure 6B.1. Workflow pour l'imagerie corrélative protéines-métaux dans les cellules et synapses (Roudeau 2014 ; Domart 2020).

Dans l'exemple de la figure 6B.2, nous avons réalisé la microscopie de protéines d'intérêt sur cellule vivante. D'abord en confocal (A) nous obtenons la fluorescence de toute la cellule et nous enregistrons les positions de l'image. Ensuite, par STED, nous imageons la fluorescence dans le cône de croissance (B), dans le cas qui nous occupe nous avons marqué l'actine (C et en magenta en A et B) et la tubuline (D et en vert en A et B). Une fois l'échantillon observé, il a été cryofixé et lyophilisé. Avant les analyses par SXRF nous avons vérifié que les neurones et les cônes de croissance d'intérêt sont bien préservés dans la cible. Pendant la préparation des échantillons, notamment dans la phase de rinçage, il se peut que certaines cellules se décollent du support ou bien que certaines structures ne se lyophilisent pas correctement. Grâce aux positions, nous pouvons retrouver le même neurone avant et après la préparation des échantillons, signalé avec une flèche

en A et E. Nous pouvons identifier les cônes de croissance imagés par STED en B et entourés en E, et finalement retrouver et imagier par SXRF (F) le cône de croissance sélectionné en B.

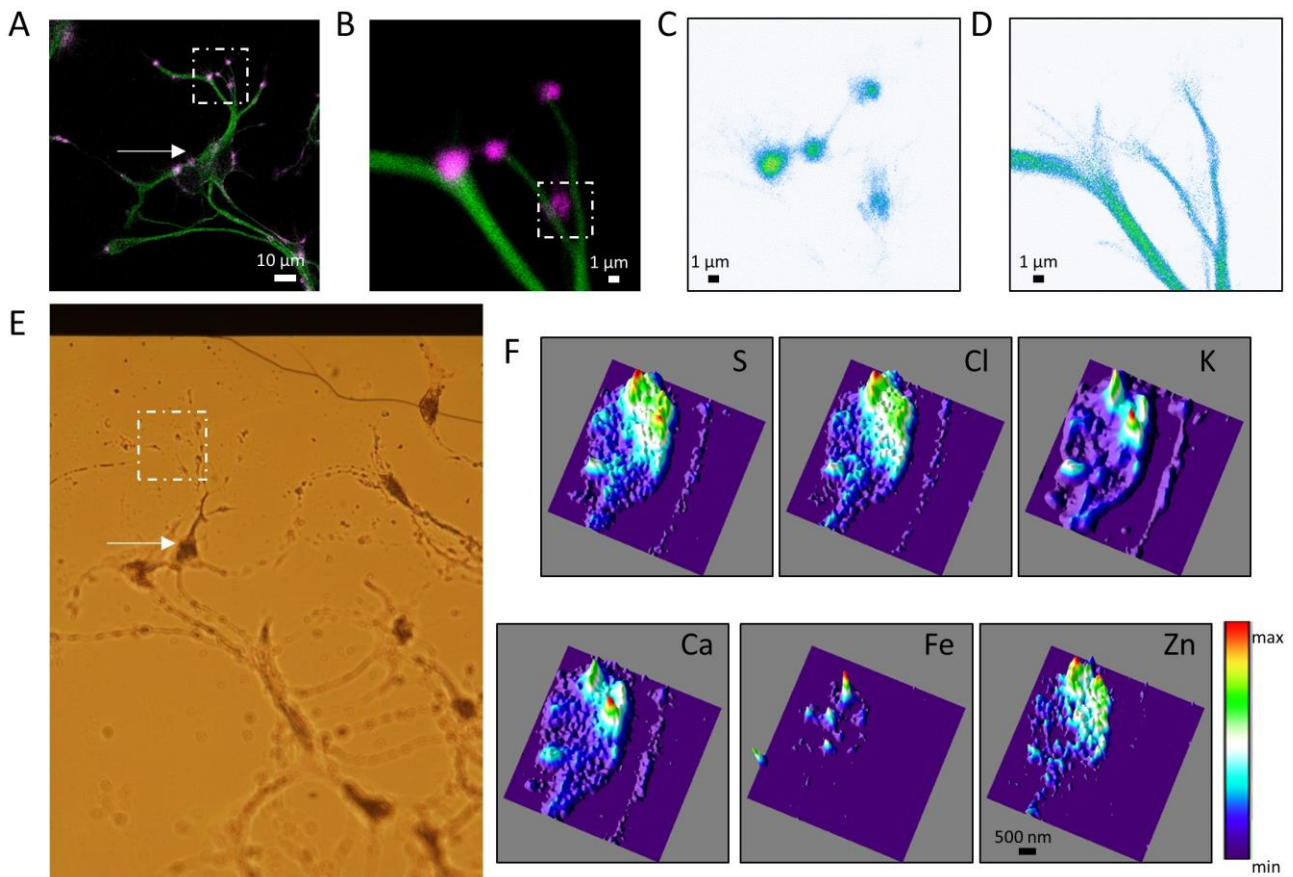


Figure 6B.2. (A, B) Fluorescence de la tubuline (vert et image D) et l'actine (magenta et image C) sur des neurones en culture. Fluorescence en confocal (A) et STED (B, C, D). (E) Image en transmission de la même zone, les flèches indiquent le même noyau neuronal que (A) et le carré le même cône de croissance que (B). (F) images SXRF du cône de croissance encadré en (B) (Carmona 2022).

Dans un autre exemple, nous pouvons apercevoir, quand on travaille avec des cellules, la nécessité de marquer le noyau et d'enregistrer les positions pour retrouver les cellules d'intérêt (Figure 6B.3). Par microscopie à épifluorescence sur cellule vivante (A, B) nous avons imagé en vert les cellules marquées avec la protéine d'intérêt (SLC30A10), en bleu le noyau et en rouge l'appareil de Golgi. Après cryofixation et lyophilisation et grâce aux positions nous avons retrouvé la zone d'intérêt, et grâce à la fluorescence du noyau après lyophilisation nous avons identifié les cellules qui fluoresçaient *in vivo* en vert et en rouge (C) et vérifié la bonne préservation de ces cellules (D). Après quoi nous avons imagé par SXRF les deux cellules voisines et obtenu la distribution des éléments. Ce sont les mêmes cellules, encadrées, que nous analysons par épifluorescence et par SXRF (Figure 6B.3).

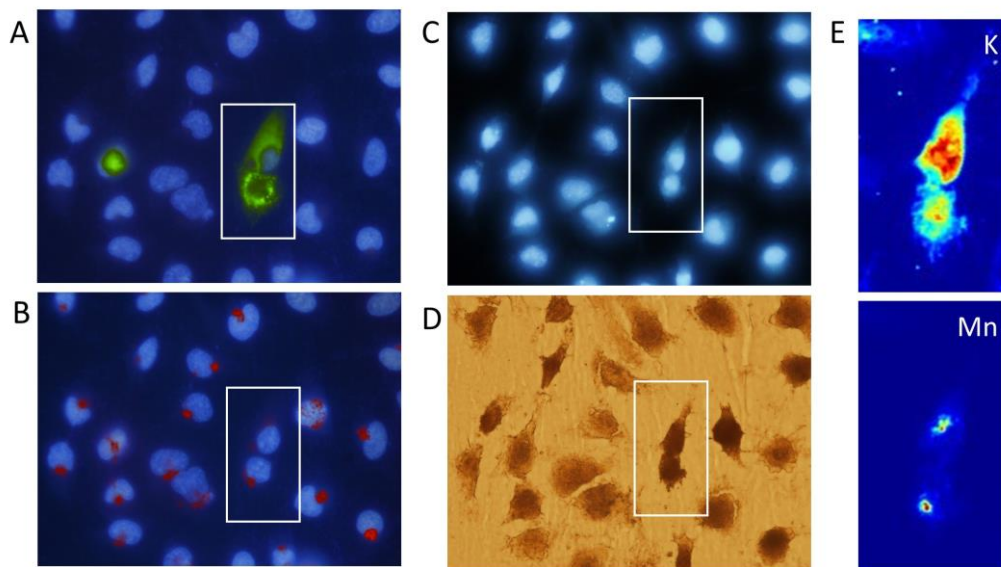


Figure 6B.3. (A, B) Fluorescence sur cellule vivante de l'appareil de Golgi (RFP), de la protéine SLC30A10 (vert) et du noyau (bleu) ; noyau après cryofixation et lyophilisation, nous retrouvons (C) la fluorescence du noyau dans la même zone et l'image en transmission de la même zone (D). En comparant les images de fluorescence des noyaux avant/après nous pouvons facilement identifier les cellules qui montraient la fluorescence et les analyser par SXRF (Carmona 2019 a).

Comme nous l'avons vu dans la partie B section 4.2.a, si nous utilisons des anticorps pour le marquage des protéines par fluorescence, l'imagerie n'est pas corrélative en soi. Nous pouvons démontrer une tendance, une redistribution ou relocalisation, mais la microscopie est faite sur des cellules différentes. Cependant, cette technique peut s'avérer d'une grande utilité pour l'analyse sur des cellules équivalentes mais de populations différentes. Le *workflow* de la figure 6B.1 a subi quelques modifications. D'abord dans l'étape 1) les cellules ou neurones sont cultivés sur des supports différents selon qu'on analyse les métaux ou les protéines. Après quoi une partie des échantillons seront cryofixés/lyophilisés et analysés par SXRF/XAS, c'est-à-dire suivant les étapes 3 et 4 du *workflow* sans passer par l'étape 2. L'autre partie des échantillons sera fixée chimiquement et observée en fluorescence, donc suivant l'étape 2 du *workflow*.

Je vais illustrer l'utilité de la fixation chimique et le marquage par anticorps (malgré leurs limitations) par une étude que nous avons faite sur la relation entre le fer et la protéine synucléine, mise en cause dans la maladie de Parkinson (Ortega 2016). Dans cet exemple, les cellules ont été cultivées sur lamelle de verre, ont été transfectées avec un adénovirus α -synucléine, et exposées à un excès du fer dans le milieu de culture. Par immunofluorescence, nous avons révélé que la protéine α -synucléine se redistribue autour du noyau cellulaire quand celle-ci est surexprimée (figure 6B.4). De manière indépendante, une autre série d'échantillons avait été cultivée sur des supports synchrotron, aussi transfectée avec l' α -synucléine et exposée au fer, cryofixée, lyophilisée et analysée sur la ligne ID22NI de l'ESRF. Les images ont montré une redistribution du fer autour du noyau quand la protéine α -synucléine est surexprimée (figure 6B.4). En comparant les images, nous pouvons émettre l'hypothèse que le fer se relocalise dans les inclusions riches en α -synucléine.

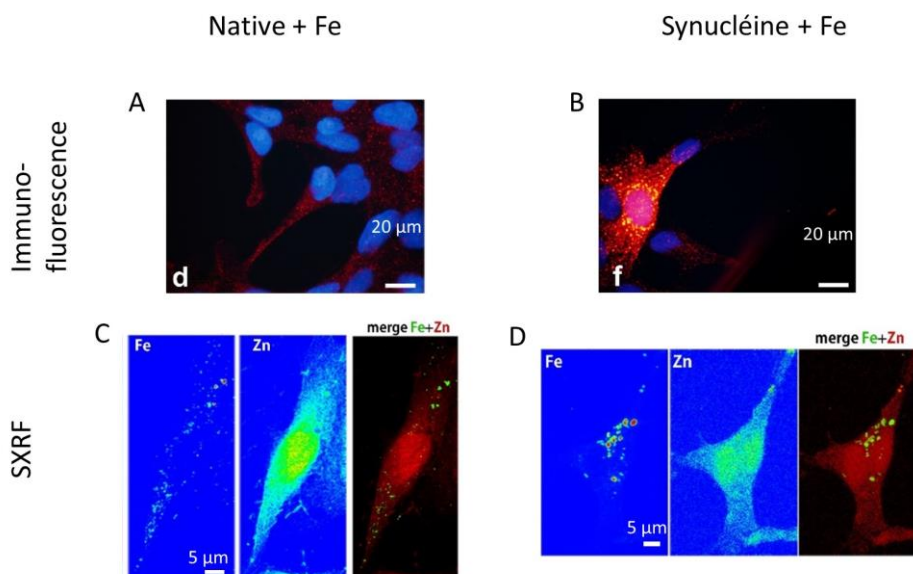


Figure 6B.4. Images d'immunofluorescence de l' α -synucléine (en rouge) sur des cellules PC12 et marquage du noyau avec Hoechst 33342 (en bleu) en conditions natives (A) ou avec surexpression de la protéine α -synucléine (B). Distribution du Fe et du Zn par SXRF sur des cellules PC12 en conditions natives (C) ou avec une surexpression de la protéine α -synucléine (D). La distribution du fer est modifiée par la surexpression et semble avoir la même localisation que la protéine α -synucléine (Ortega 2016).

6.2 Imagerie corrélative dans les tissus biologiques

L'homéostasie des métaux dans le cerveau est altérée dans de nombreuses maladies neurodégénératives et la concentration, la localisation et/ou la spéciation chimique des éléments peuvent être modifiées par rapport à des individus sains (Acevedo 2019). Ces modifications sont souvent spécifiques à la région du cerveau affectée par le processus neurodégénératif. Par exemple, la concentration en fer augmente dans la *substantia nigra* (SN) des patients atteints de la maladie de Parkinson et les réactions d'oxydoréduction du fer pourraient être impliquées dans la pathogénie. L'identification de la base moléculaire de la dyshoméostasie des métaux dans des régions spécifiques du cerveau fait l'objet de recherches intensives et les méthodes d'imagerie des éléments chimiques sont particulièrement utiles pour étudier cet organe.

Cependant, afin d'apporter des informations précises sur les modifications des métaux dans des zones spécifiques du cerveau, ces méthodes d'imagerie chimique doivent être corrélées à l'immunohistochimie des tissus cérébraux. Nous savons que les préparations immunohistochimiques basées sur la fixation chimique et la coloration ne sont pas adaptées à l'imagerie SXRF car elles sont connues pour modifier la distribution et la spéciation des éléments (Al-Ebraheem 2015 ; Chwiej 2005 ; Hackett 2011 ; Matsuyama 2010 ; Ralle 2009 ; James 2011 ; Jin 2017 ; Perrin 2015 ; Roudeau 2014 ; Davies 2014). Néanmoins, cette technique peut s'avérer d'une grande utilité pour l'analyse corrélative sur des échantillons adjacents. Dans ce but, je présente dans la figure 6B.5 le *workflow* à suivre pour la préparation d'échantillons si nous voulons rendre compatibles la préparation par histologie et observation en lumière transmise avec l'analyse des métaux.

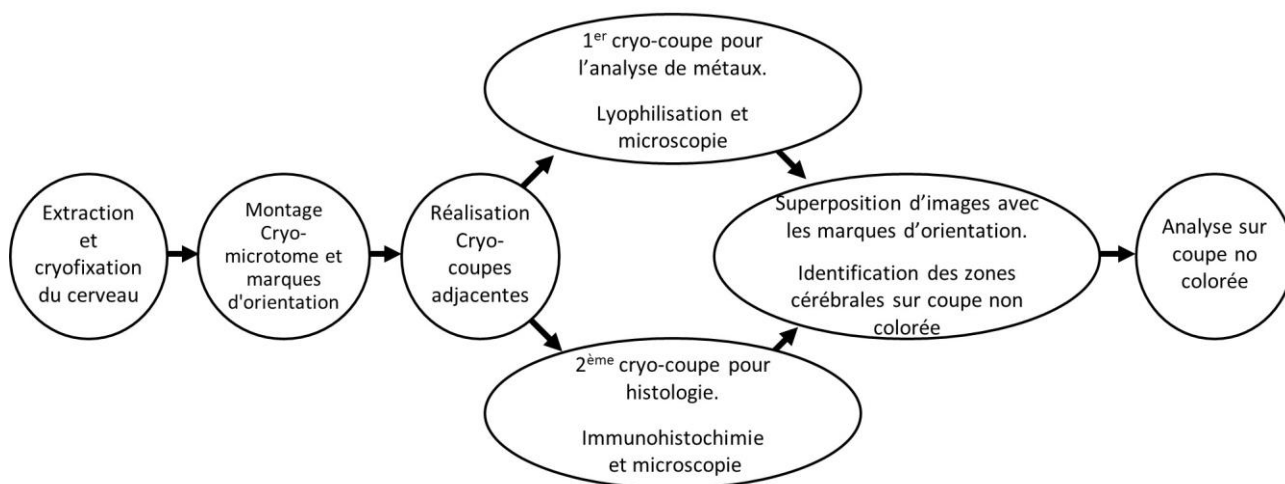


Figure 6B.5. Déroulement de la procédure visant à corréliser les régions cérébrales des cryocoupes colorées pour immunohistochimie avec des cryocoupes non colorées préparées pour l'imagerie des métaux (Carmona 2019 b).

Premièrement, il faut procéder à l'extraction et cryofixation du tissu. Après, et toujours en veillant à maintenir la température en dessous de zéro (optimum entre -35 et -25 °C), le tissu est monté dans un cryomicrotome. Une fois le système à la bonne température et le tissu monté, il faut procéder à la coupe et enlever le tissu jusqu'à arriver à la zone d'intérêt. Une fois aux alentours, il faut réaliser quelques trous dans le tissu avec une aiguille fine autour de la zone d'intérêt pour pouvoir orienter les coupes plus tard. À ce moment, il faut régler l'épaisseur des coupes. L'analyse des métaux nécessite la préparation des cryosections de tissu semi-minces ; un bon compromis est de travailler avec une épaisseur de $30\ \mu\text{m}$. La première cryosection est déposée sur un support adapté aux méthodes d'analyse par rayonnement synchrotron. Pour éviter la déformation du tissu, la coupe peut être recouverte d'un deuxième porte-échantillon. Le tissu sera placé en sandwich entre les deux de façon à le stabiliser pendant la manipulation et l'analyse. Une deuxième cryosection, immédiatement adjacente à la précédente, est coupée et placée sur une lamelle de microscopie pour la coloration histologique. Cette section peut être plus fine ($5\ \mu\text{m}$) mais en pratique, il est fastidieux de modifier l'épaisseur du cryomicrotome entre chaque section, il est donc possible de la laisser à $30\ \mu\text{m}$. Les deux sections ont une face commune, celle qui est coupée par le couteau lors de la première section. C'est la face qui nous intéresse et elle doit être déposée vers le haut sur les deux porte-échantillons (synchrotron ou lamelle de verre). C'est sur cette face commune que les analyses histologiques et des métaux auront lieu. La première coupe sera lyophilisée et observée en lumière transmise pour avoir une image optique de toute la zone. La deuxième coupe sera colorée selon la méthode choisie et observée aussi en lumière transmise pour l'identification des zones d'intérêt. Grâce aux trous percés avant la coupe nous pouvons orienter et superposer les deux images des deux coupes et donc savoir quelles sont les zones d'intérêt dans la coupe non marquée. Finalement, il reste à analyser le contenu des éléments chimiques dans la zone d'intérêt qui n'est pas marquée par histologie.

Pour illustrer cette méthodologie, je vais présenter un exemple sur la figure 6B.6 dans lequel nous avons quantifié les éléments chimiques dans différentes régions cérébrales d'intérêt. Par immuno-histologie avec le marquage de la tyrosine hydroxylase (TH) nous avons coloré les zones dopaminergiques (*substantia nigra pars compacta*, SNpc ; *substantia nigra pars reticulata*, SNpr ; l'aire tegmentale ventrale, VTA) du cerveau de rat (A, D, G). D'un autre côté et après lyophilisation, les coupes préparées pour l'analyse des métaux sont également observées par microscopie optique, et la coupe complète reconstituée (B, C). La coupe histologique est retournée horizontalement (D) pour simuler, lors de la superposition, le fait que les deux faces se touchent. Les coupes pour l'analyse des métaux (E, F) sont retournées de manière à avoir les trous orientés de la même façon que dans la coupe histologique (D). La superposition de l'image histologique (G) avec l'image de l'échantillon lyophilisé (H, I) est obtenue par la superposition des marqueurs, des trous d'épingle (représentés par des étoiles bleues). Ainsi nous pouvons déterminer les zones d'intérêt sur la coupe non marquée en préservant la distribution des éléments.

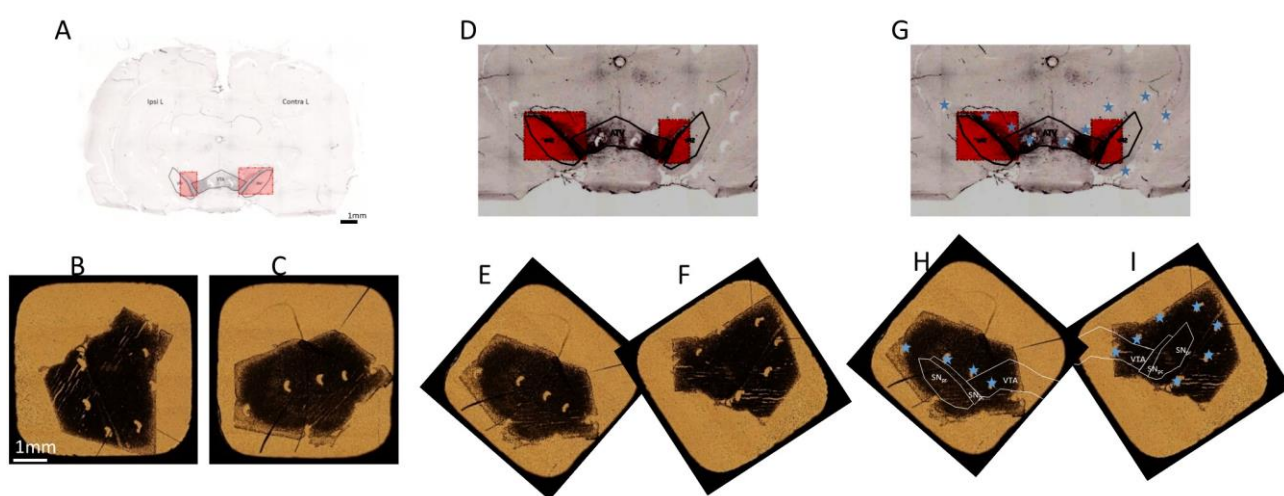


Figure 6B.6. Procédure globale de superposition des sections immuno-histochimiques et natives pour l'analyse PIXE. (A) Section entière du cerveau colorée avec la tyrosine hydroxylase (TH) pour localiser les voies dopaminergiques : SNpc, SNpr, et VTA. (B, C) Images de microscopie à transmission optique de sections lyophilisées pour les analyses PIXE (B : côté cerveau lésé et C : côté cerveau sain). (D, G) Zoom de la région colorée pour distinguer les trous d'épingle percés autour du SN (indiqués par des étoiles bleues). Ces images ont un retournement horizontal par rapport à l'image initiale afin d'obtenir la même orientation pour les trous d'épingle que sur les échantillons lyophilisés puisque les faces marquées étaient adjacentes. (E, F) Images des sections PIXE, en appliquant une rotation, pour afficher la même orientation des trous d'épingle que sur la section immuno-histochimique. (H, I) Images correctement orientées en utilisant les trous d'épingle (marqués d'une étoile bleue) pour localiser précisément les régions SNpc, SNpr et VTA sur les sections pour l'analyse PIXE. Barres d'échelle = 1 mm (Carmona 2019 b).

7. Applications : métaux et neurodégénérescence

7.1 La neurotoxicité du manganèse

Nous nous sommes intéressés au manganèse, un métal trace essentiel, mais dont l'exposition à des niveaux élevés, en milieu professionnel ou environnemental, induit le parkinsonisme, un syndrome parkinsonien irréversible qui n'a pas de traitement (Saric 2007 ; Aschner 2009 ; Chen 2015). L'étude de la neurotoxicité du manganèse est un projet de longue date dans lequel nous avons fait usage de tous les avancements concernant l'imagerie corrélative et dans lequel nous montrons toutes les capacités de ce type d'analyses pour expliquer les mécanismes de toxicité des métaux. Et d'un autre côté, il illustre aussi les limitations auxquelles nous sommes confrontés aujourd'hui et d'où j'envisage mon projet de recherche à venir.

En premier lieu, nous avons élucidé par SXRF la localisation du manganèse autour du noyau cellulaire et mis en évidence, de façon indirecte, qu'il était stocké dans l'appareil de Golgi (Carmona 2010). Plus tard, nous avons pu faire de l'imagerie corrélative épifluorescence-SXRF et nous avons montré que le manganèse colocalisait avec l'appareil de Golgi (Carmona 2014). Après cette découverte, nous avons travaillé, avec des collègues américains de l'Université d'Austin, sur la localisation du manganèse dans des cellules qui expriment une mutation mise en cause dans des formes familiales de parkinsonisme. Nous avons décelé que la mutation conduit à une accumulation du manganèse dans cet appareil de Golgi (Carmona 2019). De même, nous avons collaboré avec des collègues de l'Université de Mumbai qui ont développé un senseur moléculaire qui émet de la fluorescence quand il y a du manganèse dans les cellules. Nous avons vérifié sa localisation et corroboré qu'il va dans l'appareil de Golgi et qu'il fixe le manganèse (Das 2019).

a. Localisation du Mn dans l'appareil de Golgi : mise en évidence indirecte

Il y a quelques années, nous avons commencé à nous intéresser à la toxicité du manganèse et nous avons découvert par SXRF une localisation assez particulière du manganèse dans des cellules dopaminergiques. Les images de fluorescence des rayons X synchrotron ont révélé que dans les cellules PC12, le Mn était situé dans une région périnucléaire, toujours d'un côté du noyau (figure 7B.1). La même distribution est obtenue en conditions physiologiques, dans des cellules non exposées, ou dans des cellules exposées au manganèse à de concentrations toxiques (Carmona 2010).

Sur des cellules vivantes en culture nous avons marqué d'un côté l'appareil de Golgi (GA) avec une sonde GFP-Golgi CellLight™ reagents et d'un autre côté le réticulum endoplasmique aussi avec une sonde GFP de CellLight™. Nous avons pu observer que l'appareil de Golgi se trouvait près du noyau et toujours d'un côté de la cellule (figure 7B.2) et que le réticulum endoplasmique s'étendait dans tout le cytoplasme avec une fluorescence plus marquée tout autour du noyau (figure 7B.2). Ces résultats nous suggéraient que le manganèse s'accumule dans l'appareil de Golgi.

A l'époque de cette étude, nous n'avons pas pu préparer des échantillons marqués avec la fluorescence *in vivo* pour l'analyse par SXRF. Une toxicité apparaissait du moment où les cellules étaient co-exposées au marqueur fluorescent et au manganèse, les cellules se décollaient des supports très facilement et pendant les phases de rinçage et cryofixation toutes étaient perdues. Pour résoudre ce problème, nous avons démontré de manière indirecte que le manganèse était stocké dans l'appareil de Golgi. Nous avons exposé les cellules au manganèse et à la brefeldine A, une molécule connue pour provoquer spécifiquement

l'effondrement de l'appareil de Golgi. Après l'analyse par SXRF, il a été constaté que cette exposition entraîne une redistribution intracellulaire frappante du manganèse qui diffuse dans le cytoplasme et même le noyau (figure 7B.3) (Carmona 2010). Ces résultats indiquent que l'appareil de Golgi joue un rôle important dans la détoxification cellulaire du manganèse. En outre, nous avons quantifié la teneur en éléments traces, en utilisant la microanalyse par émission de rayons X induite par des particules (PIXE) et la spectrométrie de rétrodiffusion (RBS). Et il a été montré que l'exposition au manganèse induit une diminution de la teneur totale en fer, ce qui pourrait contribuer à la neurotoxicité globale du manganèse (Carmona 2010).

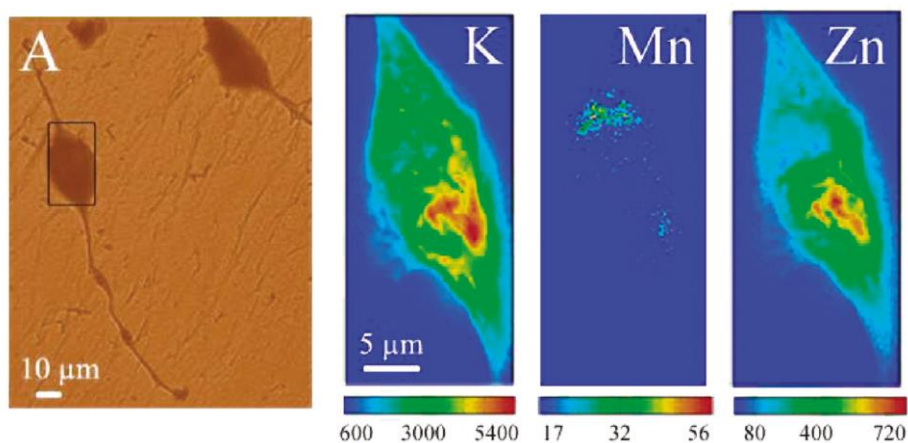


Figure 7B.1. À gauche image optique de la cellule après cryofixation et lyophilisation, le carré noir indique la zone analysée par SXRF. À droite images SXRF des éléments intracellulaires dans des cellules PC12 (Carmona 2010).

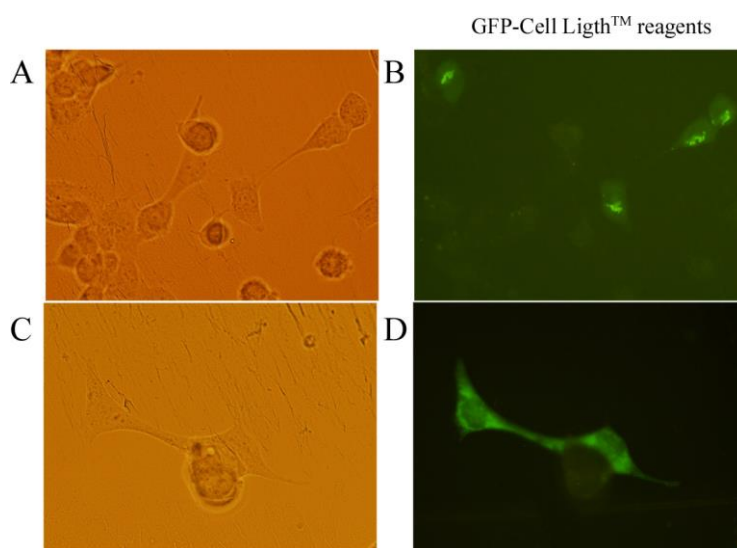


Figure 7B.2. Localisation de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique dans les cellules PC12. (A) et (C) images optiques des cellules PC12 vivantes dans le milieu de culture ; (B) image d'épifluorescence de l'appareil de Golgi sur cellule vivante (même zone que A) ; (D) image d'épifluorescence du réticulum endoplasmique sur cellule vivante (même zone que C) (Carmona 2010).

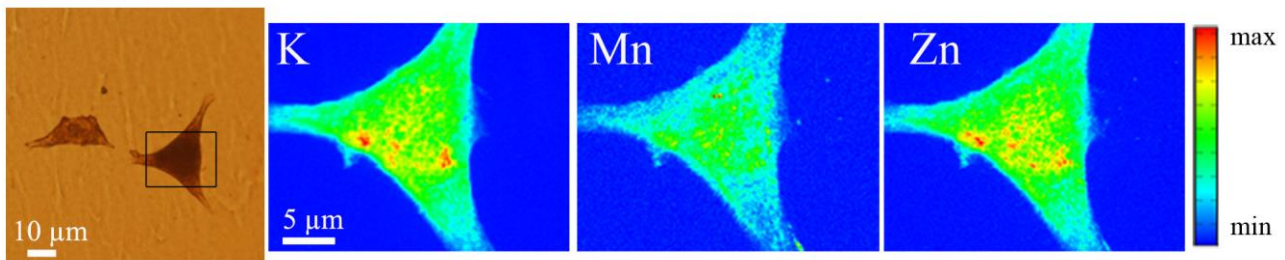


Figure 7B.3. Images de fluorescence X d'éléments intracellulaires dans des cellules PC12 exposées à 300 μ M de manganèse et à 30 μ g/ml de Brefeldin A pendant 4 heures. À gauche image optique de la cellule après cryofixation et lyophilisation, le carré noir indique la zone analysée par SXRF. À droite images SXRF de K, Mn et Zn dans des cellules PC12 exposées au manganèse et à la Brefeldin A (Carmona 2010).

b. Imagerie corrélative du Mn et de l'appareil de Golgi et spéciation subcellulaire

La principale source de Mn se trouve dans l'ingestion de nourriture et d'eau potable, mais la principale source d'excès de Mn est l'inhalation. Le Mn est présent dans les particules produites par les activités industrielles utilisant du Mn, ou par la combustion de carburant (Portier 2012). Dans des conditions d'exposition par inhalation, le Mn peut également atteindre directement le système nerveux central (SNC) par la voie olfactive (Henriksson 2000). Les formes physico-chimiques du Mn dans l'environnement sont diverses. Le Mn est présent dans des composés inorganiques solubles dans les aliments, dans des formes inorganiques insolubles dans les particules en suspension dans l'air ; dans des composés organométalliques tels que le fongicide manèbe (manganèse éthylène-1,2-bisdithiocarbamate) ou dans des adjuvants de l'essence, comme le MMT (méthylcyclopentadiényl manganèse tricarbonyle).

Il est connu que la spéciation chimique d'un élément détermine sa biodisponibilité et sa réactivité et donc la toxicité peut être très différente en fonction de sa spéciation chimique, par exemple en fonction de son état d'oxydation. Nous nous sommes intéressés à la neurotoxicité spécifique des différents composés environnementaux du Mn. Nous avons examiné les mécanismes de cytotoxicité de cinq composés du Mn (MnCl_2 , MnSO_4 , Mn_2O_3 , manèbe et MMT) représentatifs des principales conditions d'exposition environnementale et présentant diverses caractéristiques physico-chimiques en matière d'état d'oxydation, de formes organiques/inorganiques et de solubilité (Henriksson 2000 ; Aschner 2006 ; Portier 2012 ; Bornhorst 2012).

Notre objectif était de déterminer quels composés environnementaux étaient les plus toxiques pour les cellules dopaminergiques, la distribution et la quantité de manganèse accumulée dans les cellules selon l'exposition et l'état d'oxydation que présentait le manganèse à l'intérieur des cellules. Pour chaque élément indépendamment nous avons étudié sa toxicité et déterminé par microscopie d'épifluorescence sur cellule vivante la localisation de l'appareil de Golgi. Après observation et enregistrement des positions des cellules montrant de la fluorescence, nous avons procédé à la cryofixation et conservation des échantillons refroidis dans des vapeurs d'azote jusqu'aux analyses. Cette fois les reagents CellLight™ n'induisaient pas de toxicité et les cellules marquées restaient accrochées aux supports pendant les étapes de rinçage et cryofixation.

Au synchrotron, grâce à la technique SXRF, nous avons déterminé la localisation du manganèse et, ensuite, avec la technique XANES (*X-ray Absorption Near Edge Structure*) nous avons déterminé l'état d'oxydation du manganèse qui se trouvait à l'intérieur de la cellule. Nous avons confirmé, par des analyses cryogéniques, que le manganèse s'accumule dans l'appareil de Golgi (figure 7B.4) et il le fait sous forme de Mn^{2+} indépendamment de l'état d'oxydation du composé initial (figure 7B.5). En conclusion, nous avons trouvé que dans le cytoplasme, en dehors de l'appareil de Golgi, il y a des quantités très faibles de manganèse. Nous avons, pour la première fois, fait de la spéciation à l'échelle d'un organe intracellulaire et nous avons élucidé que le manganèse se trouve sous forme Mn^{2+} , une forme peu toxique. Nous avons conclu que la toxicité des différents composés semble venir de la partie soluble et que les composés organiques sont plus toxiques (Carmona 2014).

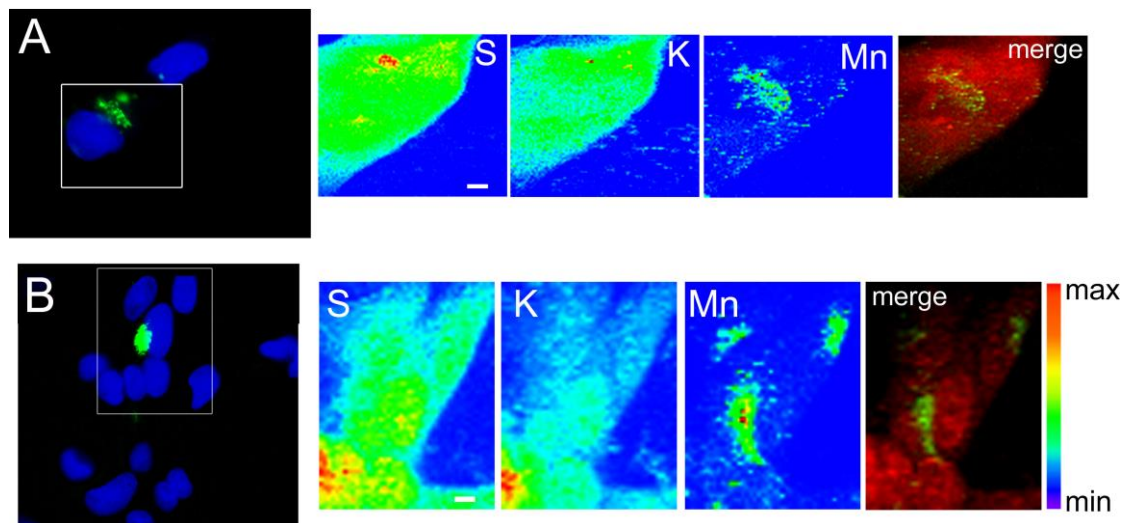


Figure 7B.4. Colocalisation du Mn et de l'appareil de Golgi dans des cellules PC12 exposées à (A) 500 μM de $MnCl_2$ et (B) 500 μM de $MnSO_4$ pendant 24 heures. À gauche fluorescence de l'appareil de Golgi marquée avec les protéines GFP (vert) et du noyau à l'aide de la coloration de Hoechst 33342 (bleu) dans des cellules PC12 vivantes avant la cryofixation. Les carrés blancs indiquent les zones analysées par micro-SXRF en conditions cryogéniques. À droite les cartes élémentaires de S, K et Mn et les images fusionnées de K (rouge) et Mn (vert), obtenues sur la ligne ID21 à l'ESRF, barres d'échelle de 5 μm (Carmona 2014).

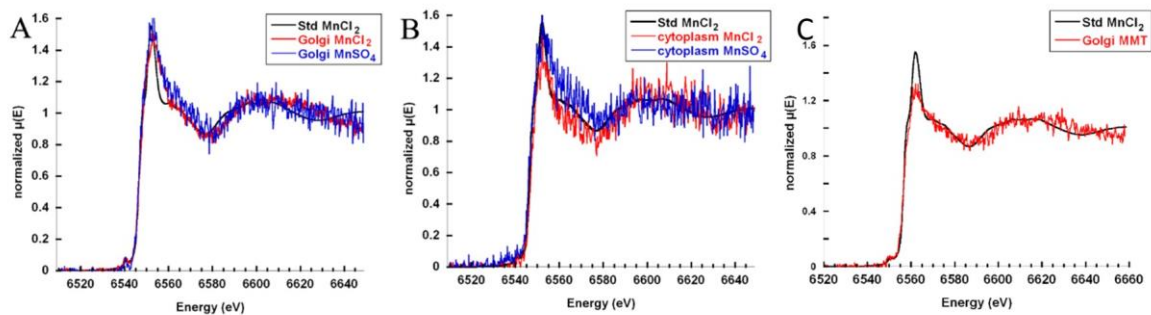


Figure 7B.5. Spectres XANES obtenus sur la ligne ID21 à l'ESRF en mode cryogénique du (A) standard $MnCl_2$ et du manganèse dans l'appareil de Golgi des cellules individuelles exposées au $MnCl_2$ et au $MnSO_4$; (B) du manganèse dans le cytoplasme des mêmes cellules analysées en A; (C) du manganèse à l'intérieur des cellules individuelles exposées au MMT (Carmona 2014).

c. Formes familiales de parkinsonisme : accumulation du Mn dans l'appareil de Golgi

Récemment, des mutations du gène SLC30A10 ont été associées à une nouvelle forme de parkinsonisme familial (Tuschl 2012 ; Quadri 2012 ; Mukhopadhyay 2018). Les analyses cliniques révèlent une augmentation du manganèse dans le foie, le sang et le cerveau des patients. La protéine SLC30A10 est un transporteur d'efflux de Mn localisé à la surface des cellules, qui réduit les niveaux de Mn et protège contre sa toxicité (Leyva-Illades 2014; Hutchens 2017 ; Zogzas 2016 ; Chen 2015). Il est important de noter que les mutations de la protéine SLC30A10, qui sont à l'origine du parkinsonisme familial, bloquent la capacité du transporteur à se rendre à la surface cellulaire et à servir de médiateur pour l'efflux de Mn. Bien que les expressions des mutations SLC30A10 causant la maladie ne soient pas délétères en elles-mêmes, les neurones exprimant ces mutants ont montré une sensibilité accrue à la toxicité du Mn (Leyva-Illades 2014). On peut s'attendre à ce que les mutations SLC30A10 modifient le stockage subcellulaire du Mn. La compréhension des voies moléculaires de détoxification du Mn dans les cellules normales et mutantes impliquées dans l'apparition de la forme familiale de parkinsonisme permettra par exemple d'envisager l'utilisation d'un efflux accru de Mn comme stratégie thérapeutique.

L'objectif de ce projet est d'élucider la distribution du manganèse dans les cellules exprimant la protéine SLC30A10, exprimant un de ses mutants pathologiques SLC30A10-delta 105-107 et des cellules contrôles, en utilisant l'imagerie par fluorescence des rayons X synchrotron (SXRF) et l'imagerie corrélative avec le marquage par épifluorescence de l'appareil de Golgi. Ce projet est le fruit d'une collaboration avec l'équipe de Somshuvra Mukhopadhyay, de l'Université du Texas à Austin, qui a développé des modèles cellulaires pour étudier les effets biologiques de la protéine SLC30A10 et des mutants associés (Leyva-Illades 2014). Nous avons découvert que le Mn s'accumule, dans des conditions physiologiques (figure 7B.6) et après exposition au Mn (figure 7B.7), dans l'appareil de Golgi des cellules transfectées avec le mutant SLC30A10-Δ105-107 causant la maladie. Les cellules contrôles, marquées avec une construction GFP Rab5, accumulent aussi le Mn puisque n'exprimant pas la protéine SLC30A10 à l'état basal. Et les cellules exprimant la protéine SLC30A10, montrent une teneur en Mn très faible après n'importe quelle condition d'exposition, ce qui confirme l'efficacité de l'efflux de Mn par cette protéine (figures 7B.6 et 7B.7). Ces premiers résultats ont été obtenus sur la ligne P06 du synchrotron allemand DESY et les analyses ont été réalisées à température ambiante sur des échantillons lyophilisés (Carmona 2019 a).

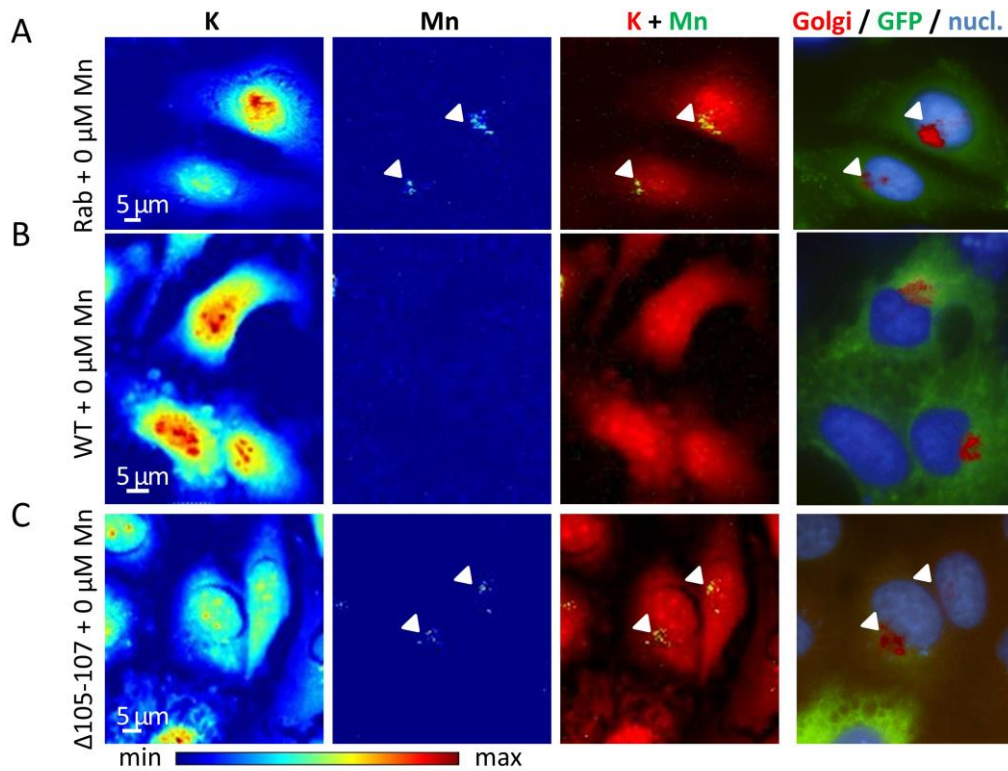


Fig. 7B.6. Exemples représentatifs de l'imagerie SXRf du potassium (K) et du manganèse (Mn) dans des cellules HeLa transfectées avec une construction SLC30A10 (vert) et non exposées au Mn. Comparaison avec la distribution de l'appareil de Golgi (rouge) et du noyau (bleu) obtenus par microscopie à épifluorescence sur cellule vivante. (A) cellules transfectées avec GFP-Rab5, donc condition témoin ; (B) cellules transfectées avec GFP-SLC30A10-WT, donc la protéine est normale ; (C) cellules transfectées avec GFP-SLC30A10- Δ 105-107, donc protéine mutante, causant la maladie. Les flèches indiquent la colocalisation du Mn et de l'appareil de Golgi. Images obtenues sur la ligne P06 à DESY (Carmona 2019 a).

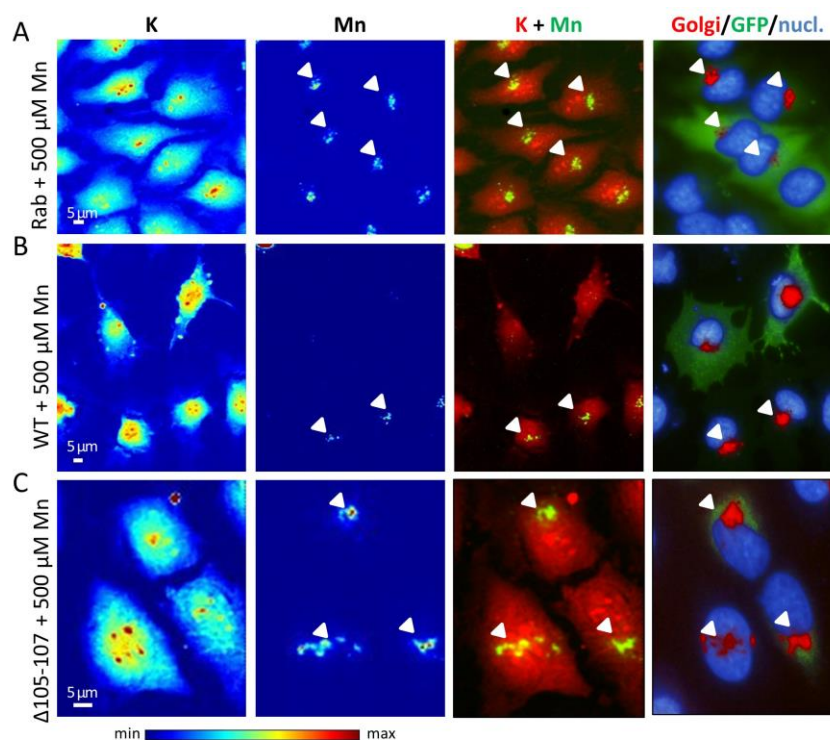


Fig. 7B.7. Exemples représentatifs de l'imagerie SXR du potassium et du manganèse dans des cellules HeLa transfectées avec une construction SLC30A10 (vert) et exposées à 500 μM de Mn. Comparaison avec la distribution de l'appareil de Golgi (rouge) et du noyau (bleu) obtenus par microscopie à épifluorescence sur cellule vivante. (A) cellules transfectées avec GFP-Rab5, donc condition témoin ; (B) cellules transfectées avec GFP-SLC30A10-WT, donc la protéine est normale. Seules les cellules en vert expriment la protéine sauvage ; (C) cellules transfectées avec GFP- SLC30A10- Δ 105-107, donc protéine mutante, causant la maladie. Les flèches indiquent la colocalisation du Mn et de l'appareil de Golgi. Images obtenues sur la ligne P06 à DESY (Carmona 2019 a).

La nano-imagerie cryogénique SXR récemment développée à l'ESRF ID16A (résolution < 50 nm) nous a permis de mettre en évidence que le Mn était piégé dans des vésicules uniques à l'intérieur de l'appareil de Golgi (figure 7B.8). Nos résultats confirment le rôle de la protéine SLC30A10 dans l'efflux de Mn et l'accumulation de Mn dans les cellules exprimant la mutation de la SLC30A10- Δ 105-107 causant la maladie. De plus, nous avons identifié les vésicules de l'appareil de Golgi comme le principal compartiment d'accumulation de Mn dans les mutants SLC30A10, ce qui suggère des interactions avec le mécanisme de trafic vésiculaire comme cause de la maladie (Carmona 2019 a). Les protéines mutantes pathologiques SLC30A10- Δ 105-107 sont bloquées dans le réticulum endoplasmique, empêchant la translocation vers la membrane plasmique et l'écoulement du Mn. De ce fait, l'excès de Mn est stocké à l'intérieur des vésicules de l'appareil de Golgi. Il est connu que, à des concentrations élevées, le Mn devient toxique, probablement parce qu'il perturbe les fonctions de l'appareil de Golgi où il s'accumule fortement en l'absence de SLC30A10 fonctionnelle. Nous supposons que l'altération du trafic vésiculaire pourrait être à l'origine de la toxicité des mutations de la SLC30A10. Ensuite, il serait intéressant d'étudier si le Mn provoque des défauts dans le trafic vésiculaire de Golgi et par conséquent sur les neurotransmetteurs ou l'excrétion endocrine. Il sera aussi très intéressant de voir si le manganèse sort de l'appareil de Golgi et de déterminer à quelle protéine il est fixé dans ces vésicules.

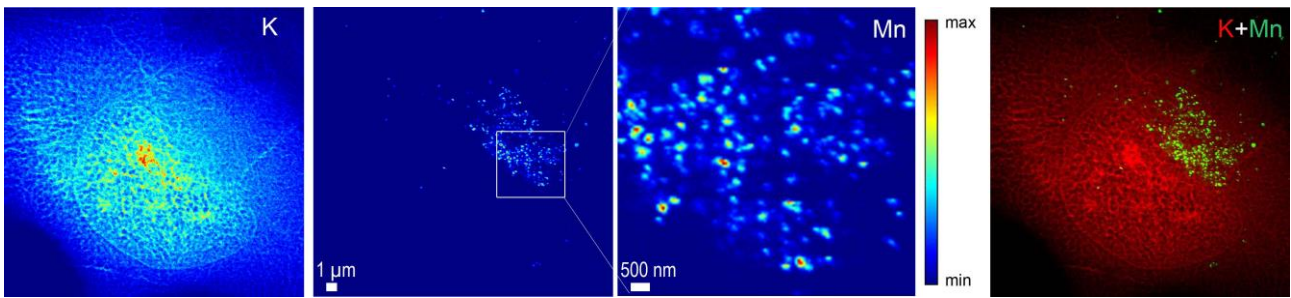


Figure 7B.8. Distributions du potassium (K) et du manganèse (Mn) obtenues à haute résolution spatiale dans une cellule transfectée avec la protéine SLC30A10-Δ105-107-GFP et exposée à 500 μM Mn. Un zoom dans la zone riche en Mn révèle la distribution ponctuelle du Mn dans des structures uniques et aussi petites que la taille du faisceau, 50 nm. Images obtenues sur la ligne ID16A à l'ESRF (Carmona 2019 a).

d. Validation de la localisation d'un senseur fluorescent du Mn

Toujours sur le manganèse, mais cette fois en collaboration avec des collègues de l'Institut de chimie de l'institut TATA à Mumbai en Inde nous avons travaillé sur la localisation intracellulaire d'un capteur fluorescent de manganèse qu'ils ont développé. Nos collègues ont mis au point un capteur qui émet de la fluorescence en fonction de la quantité de manganèse présent dans les cellules. Ils ont exposé les cellules HEK293T au capteur, appelé M1, et afin d'identifier les compartiments intracellulaires dans lesquels il s'accumule, ils ont marqué aussi l'appareil de Golgi, les endosomes, les lysosomes et les mitochondries. Des images représentatives des expériences de microscopie confocale sont présentées sur la figure 7B.9. Les données d'émission du capteur M1 ont montré une coloration périnucléaire qui s'est nettement colocalisée avec le traceur de Golgi, figure 7B.9. Donc le capteur développé, M1, s'accumule dans l'appareil de Golgi et l'intensité de la fluorescence augmente en fonction de la quantité de manganèse à laquelle les cellules ont été exposées.

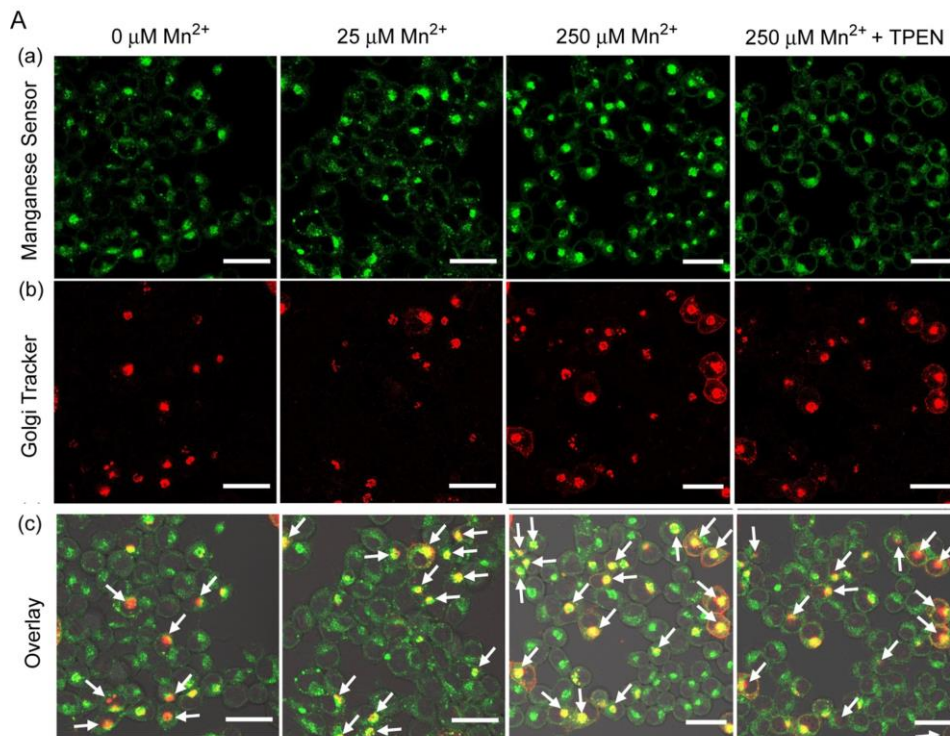


Figure 7B.9 (A) De gauche à droite, images confocales de cellules HEK293T vivantes avec : aucune exposition externe au Mn croissante, et une exposition à 250 μM MnCl_2 suivie d'une exposition à un chélateur d'ions métalliques divalents (TPEN). Les cellules ont été transduites avec CellLight Golgi-RFP et incubées avec 5 μM M1. a) Émission du capteur M1 dans le vert ; b) Émission de Golgi-RFP dans le rouge. Toutes les cellules n'ont pas incorporé le traceur Golgi ; c) Superposition d'images confocales. Des flèches blanches indiquent les régions représentatives à forte intensité dans les canaux rouge et vert, ce qui indique une colocalisation. Barres d'échelle = 30 μm (Das 2019).

Avec la technique de SXRF, sur la ligne Nanoscopium au synchrotron français SOLEIL, nous avons mis en évidence que dans les cellules HEK293T le manganèse s'accumule bien dans l'appareil de Golgi (figure 7B.10). Nous avons montré aussi que la quantité de manganèse dans l'appareil de Golgi augmente en fonction de la quantité de manganèse dans le milieu de culture, comme la fluorescence du capteur. Ces expériences ont permis de valider de manière cruciale la capacité qu'a le capteur M1 de détecter le Mn^{2+} dans les cellules vivantes, puisque les deux s'accumulent au même endroit, dans l'appareil de Golgi. Dans l'avenir, la capacité du capteur M1 à détecter le manganèse ouvrira des possibilités de quantification des niveaux de Mn puisqu'il pourra être utilisé sur des cellules vivantes pour évaluer en temps réel l'incorporation du manganèse dans les cellules en fonction des conditions d'expositions (Das 2019). Néanmoins, la stabilité du capteur après synthèse chimique étant très courte des progrès sur la structure permettant d'en améliorer la stabilité sont encore nécessaires pour le rendre plus facilement utilisable.

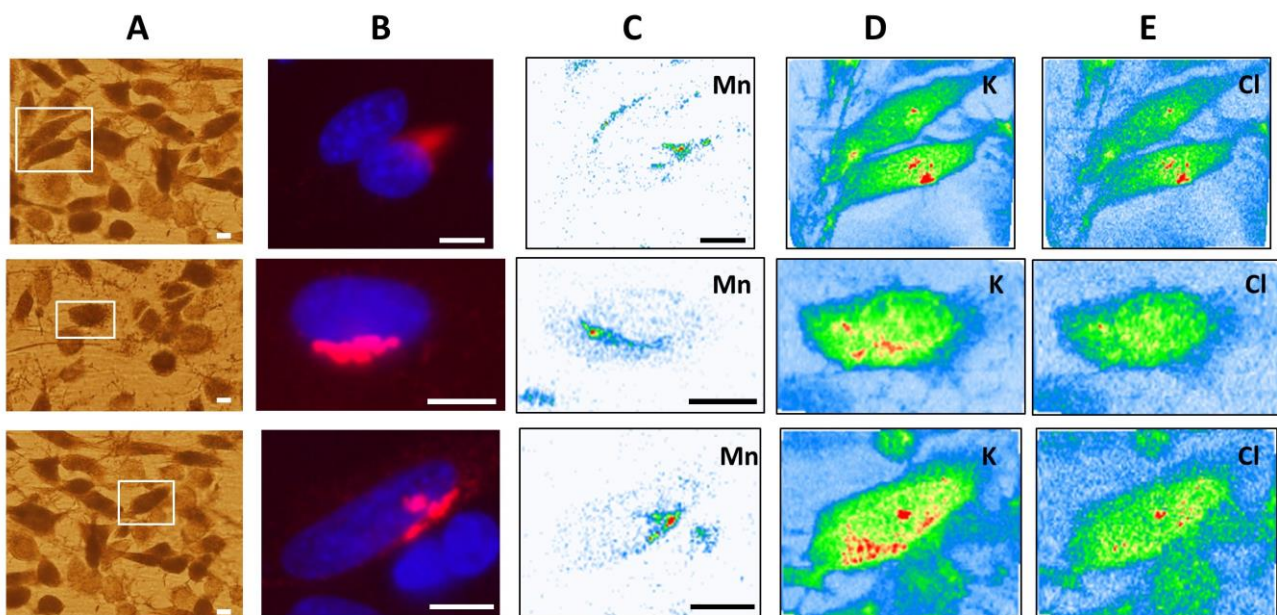


Figure 7B.10. (A) Images de transmission représentatives de cellules HEK 293T exposées à $250 \mu\text{M Mn}^{2+}$ après cryofixation et lyophilisation. (B) Images d'épifluorescence du traceur de Golgi (rouge) et de coloration du noyau (bleu) sur cellules vivantes, toutes les cellules n'ont pas incorporé le traceur de Golgi. Images par nano-SXRF des mêmes cellules indiquées en B (C) image du Mn. (D) Carte de potassium et (E) Carte de chlorure. Les flèches indiquent la colocalisation du Golgi et du Mn. Images obtenues sur la ligne Nanoscopium à SOLEIL. Barres d'échelle : $10 \mu\text{m}$ (Das 2019).

7.2 Fe et maladie du Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) se caractérise par la perte progressive de neurones dopaminergiques dans la *substantia nigra pars compacta* (SNpc). L'étiologie de la MP est mal comprise et est multifactorielle, avec des apports de facteurs génétiques, environnementaux et endogènes, parmi lesquels la dyshoméostasie du Fe. Dans la MP, il y a une augmentation spécifique de la concentration de Fe dans la SNpc par rapport aux individus du même âge non atteints de la maladie (Jellinger 2013; Ward 2014), qui pourrait être impliquée dans la perte sélective de neurones dopaminergiques dans cette région du cerveau (pour revue : Sian-Hülsmann 2011 ; Ward 2014 ; Liddell 2018). Il a été proposé comme biomarqueur pour le diagnostic précoce de la MP la quantification d'une augmentation du Fe chez les patients en utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Guan 2017). Mais certaines études n'ont pas observé une telle augmentation dans la SN des cerveaux de parkinsoniens (revue dans : Friedman 2012). En plus certaines études montrent que la teneur en Fe est plus élevée dans la SNpr des individus sains (la région de la SN qui n'est pas affectée par la perte neuronale dans la MP) que dans la SNpc (Drayer 1986 ; Morris 1994 ; Morawski 2005).

Tous ces résultats reflètent la complexité de cette évaluation du contenu en fer dans la substance noire. Pour ce motif, nous avons décidé d'utiliser la microanalyse par PIXE et par rayonnement synchrotron pour obtenir la distribution du contenu en Fe (et autres éléments) dans des régions cérébrales spécifiques. Pour ce fait nous avons utilisé un modèle animal pour reproduire cette dyshoméostasie de Fe dans la SN. Et nous avons employé l'imagerie corrélative sur des tissus adjacents en identifiant la SNpc et la SNpr par marquage immuno-histochimique de la tyrosine hydroxylase (TH) dans des coupes de cerveau animal.

Nous avons également étudié des modèles cellulaires de la MP. Les corps de Lewy ou *Lewy bodys* (LBs) sont des inclusions protéiques intraneuronales caractéristiques des maladies à corps de Lewy (LBDs), dont la MP. Les LBs sont principalement composés d'alpha-synucléine et sont considérés comme caractéristiques de la MP (Lashuel 2013) (Wakabayashi 2013). Dans ce sens nous avons étudié la distribution et quantification du fer dans des cellules surexprimant la protéine d'alpha-synucléine et nous avons mis en évidence que le fer se relocalise quand cette protéine est surexprimée dans ce qui semble être des agrégats d'alpha-synucléine. Après ces résultats encourageants et sur des tissus du cerveau humain nous avons marqué les LB et les neurones à neuromélanine (par marquage histochimique). Grâce à l'imagerie corrélative sur tissus adjacents nous avons identifié ces structures sur les coupes non marquées et nous les avons analysées par PIXE. Nous n'avons pas trouvé de différences dans le contenu en fer de LB et des neurones à neuromélanine. Ce qui indiquerait que le rôle des LBs dans la pathologie de cette maladie n'est pas de complexer les métaux. En plus nous avons mis en évidence que les patients atteints de la MP n'ont pas tous comme caractéristique commune l'augmentation du fer dans la substance noire. Donc notre conclusion est que l'augmentation en fer n'est pas une condition requise pour développer la maladie, donc le fer jouerait un rôle plutôt d'accélérateur ou serait une conséquence, mais il ne serait pas le déclencheur de la maladie.

a. Modèle animal

Des modèles animaux tels que le rat lésé à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) ont été développés pour étudier la MP. La 6-OHDA induit une dégénérescence progressive de la voie nigrostriatale, principale caractéristique anatomique de la MP (He 1996 ; Wang 2004 ; Hare 2009, Hare 2010 ; Dexter 2011). Nous avons utilisé ce modèle animal pour reproduire certaines caractéristiques de la dyshoméostasie du Fe dans la MP, en particulier l'augmentation du Fe dans la SNpc. Nous avons réalisé ce projet en collaboration avec Marc Savasta et Carole Carcenac de l'Institut des neurosciences de l'Université Grenoble Alpes.

Dans cette étude, nous avons analysé des coupes de tissus provenant de 15 animaux lésés (6-OHDA) et 12 animaux témoins (*sham*). La lésion était unilatérale, mais les deux côtés du cerveau ont été analysés (IpsiL : lésé ; ContraL : non lésé). Comme expliqué dans la section 6.2, nous avons utilisé l'imagerie corrélative sur tissus adjacents. Le cerveau des animaux a été cryofixé et sectionné en gardant des coupes adjacentes. Une dans laquelle par marquage immuno-histologique de la tyrosine hydroxylase (TH) nous avons coloré les zones dopaminergiques : *substantia nigra pars compacta* (SNpc), *substantia nigra pars reticulata* (SNpr) et l'aire tegmentale ventrale (VTA). Et la section adjacente qui a été lyophilisée et gardée en conditions natives. Par superposition des deux coupes, nous avons identifié les zones dopaminergiques dans la coupe non marquée (figure 6B.6) et quantifié par PIXE le contenu métallique dans les différentes zones (figure 7B.11).

Lorsque l'on compare les côtés et les régions d'intérêt entre les animaux lésés et les témoins, les concentrations de Fe sont inchangées (figure 7B.11). Ce résultat indique que l'injection de 6-OHDA n'a pas modifié de manière significative la teneur en Fe dans la SNpc, la SNpr et la VTA des animaux atteints de lésions, malgré une diminution de l'expression du TH de l'ordre de 35 à 85 % (moyenne de 60 %). D'autre part, la teneur en Fe a été trouvée statistiquement plus élevée dans la SNpr que dans la SNpc et que dans la VTA, pour chaque côté du cerveau et pour toutes les conditions (figure 7B.11). Nous avons constaté que la teneur en Fe est bien compartimentée dans les trois régions dopaminergiques, les valeurs les plus faibles étant relevées dans la VTA et les plus élevées dans la SNpr. Donc, la lésion avec la 6-OHDA, même si elle induit une dégénérescence des neurones dopaminergiques, ne conduit pas à une augmentation du fer dans

la *substantia nigra*. En revanche, nos résultats mettent en garde sur le fait que si la maladie de Parkinson provoque une perte de neurones de la *substantia nigra pars compacta* et que la quantité de fer dans la *substance totale nigra* est mesurée, alors une augmentation fictive de la concentration en fer sera obtenue si nous mesurons le fer dans la *substantia nigra* dans sa globalité pour des individus atteints de la maladie. Augmentation qui vient du fait que nous ne mesurons pratiquement que le fer dans la *substantia nigra pars reticulata* et la quantité dans cette zone du cerveau est plus élevée que dans la *pars compacta*.

Une partie des échantillons préparée pour l'analyse par fluorescence des rayons X a été maintenue en condition congelée-hydratée (sans être lyophilisée) pour pouvoir déterminer l'état d'oxydation. Pour ces échantillons, à la jonction entre la SNpc et SNpr, nous avons cartographié la distribution du Fe et du Mn par micro-SXRF (le Mn était inférieur à la limite de détection pour les analyses en micro-PIXE mais pouvait être détecté par SXRF qui est une méthode plus sensible). Nous avons observé que, contrairement à la distribution du Fe, l'intensité du Mn est plus élevée dans la SNpc que dans la SNpr (figure 7B.12). Cette accumulation préférentielle de Mn dans la SNpc apparaît dans les cas d'animaux témoins et lésés par la 6-OHDA et dans les deux parties du cerveau, Ipsil et ContraL, donc elle est physiologique. Grâce aux méthodes de corrélation, nous avons mis en évidence une compartimentation inverse du Fe et du Mn à l'intérieur des deux zones (*pars compacta* et *pars reticulata*) qui composent la *substantia nigra*. Finalement nous avons analysé par micro-XANES l'état d'oxydation du fer et nous n'avons pas constaté de variations selon la lésion ou la zone du cerveau. Nos données indiquent que le Fe était présent exclusivement à l'état d'oxydation Fe(III) dans tous les échantillons, et avec une signature spectrale XANES similaire à celle de la ferritine (figure 7B.13).

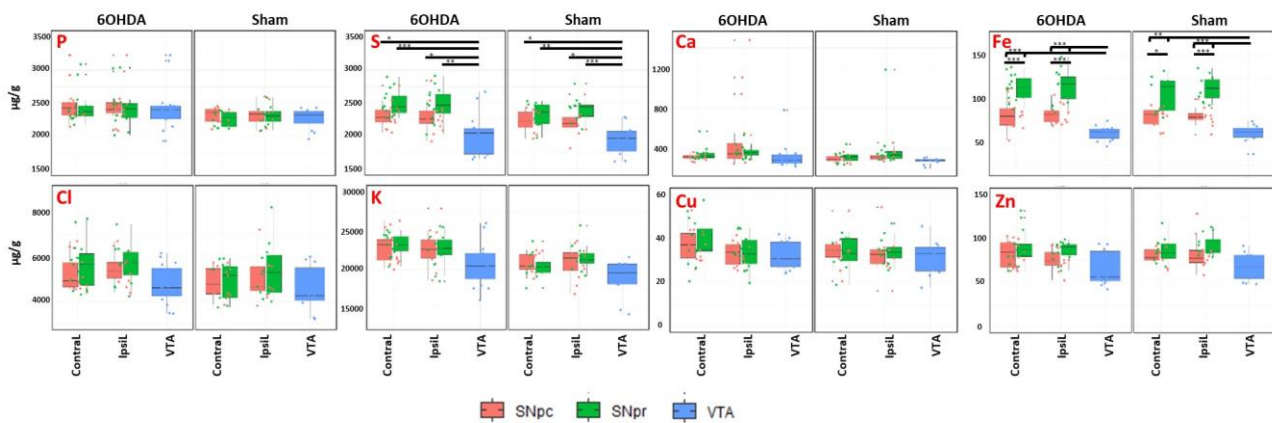


Figure 7B.11. Boîtes à moustaches des concentrations élémentaires (P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn) (exprimées en µg/g de masse sèche) pour les animaux lésés au 6-OHDA et contrôles dans les différentes régions du cerveau (SNpc, SNpr, VTA) et pour les deux côtés du cerveau (Ipsil et ContraL). Quantification faites à AIFIRA par PIXE/RBS (Carmona 2019 b).

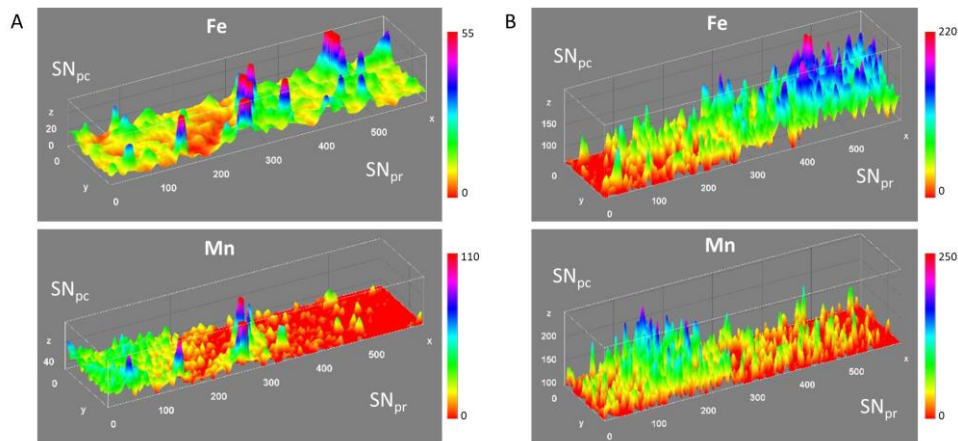


Figure 7B.12. Cartes de distribution micro-SXRF représentatives du Fe et du Mn à la jonction de la SNpc et la SNpr. (A) le côté ContraL d'un cerveau de rat témoin. (B) le côté ContraL d'un cerveau de rat lésé par la 6-OHDA. Des distributions similaires ont été trouvées dans d'autres cas, ce qui montre que la distribution compartimentée du Mn n'est pas un effet du 6-OHDA. Ligne synchrotron LUCIA, SOLEIL (Carmona 2019 b).

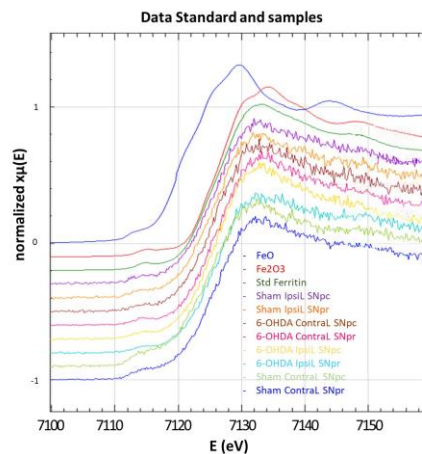


Figure 7B.13. Spectres d'absorption des rayons X (XAS) à proximité du seuil d'absorption du Fe pour les composés FeO, Fe₂O₃ et standard de ferritine ainsi que les spectres obtenus dans les échantillons de tissu pour les animaux témoins et lésés à la 6-OHDA dans la SNpc et SNpr pour les deux côtés cérébraux. Les spectres obtenus sur les échantillons présentent la forme de celui de la ferritine et le standard de Fe(III). Ligne synchrotron LUCIA, SOLEIL (Carmona 2019 b).

b. Fe et synucléine dans les cellules

Comme dit précédemment, une des caractéristiques principales de la MP est la formation des agrégats protéiques intraneuronaux, appelés corps de Lewy (LB), qui se composent principalement de la protéine α -synucléine. Il a été suggéré que la présence de niveaux accrus de fer peut favoriser l'agrégation de l' α -synucléine (Ostrerova 2000 ; Kostka 2008) et aussi que le fer a un rôle dans l'oligomérisation et l'agrégation de l' α -synucléine (Li 2010 ; Hillmer 2010 ; Peng 2010 ; He 2011 ; Jinsmaa 2014). Dans la présente étude, et en collaboration avec Paul Lingor de l'Université de médecine de Göttingen, nous avons examiné l'hypothèse selon laquelle l'augmentation des niveaux intracellulaires d' α -synucléine pourrait modifier la teneur en fer intracellulaire (Ortega 2016).

Le professeur Seung-Jae Lee de l'Université Konkuk en Corée (Lee 2002) nous avait aimablement fourni le vecteur adénovirus α -synucléine pour la transfection des cellules. En transfectant les cellules avec cet adénovirus, la protéine α -synucléine est surexprimée dans les cellules. La détection de celle-ci se fait par immunofluorescence et donc, comme expliqué dans la section 6B.1, nous avons préparé deux séries d'échantillons de manière indépendante. D'un côté nous avons préparé des échantillons pour l'analyse PIXE et SXRF sans marquage et par méthode cryogénique et d'un autre côté des échantillons marqués avec des anticorps contre cette protéine α -synucléine en utilisant des méthodes de fixation chimique et en localisant la protéine par immunofluorescence. Dans les deux séries nous avons six types d'échantillons : témoin (sans aucune exposition), témoin+Fe (cellules exposées à un excès de fer dans le milieu de culture), U_0 (cellules exposées à une construction adénovirus vide), U_0 +Fe (cellules exposées à l'adénovirus vide et au fer), Syn (cellules exposées à la construction adénovirus qui surexprime l' α -synucléine), Syn+Fe (cellules exposées à l'adénovirus α -synucléine et un excès de fer).

Sur les échantillons colorés par immunofluorescence nous avons obtenu que la distribution de l' α -synucléine endogène dans les cellules PC12 n'a pas été modifiée par l'exposition au fer (figure 7B.14 a, d) ou après traitement avec le vecteur adénoviral vide (figure 7B.14 b, e). Cette distribution est comparable aux résultats précédemment publiés montrant une petite distribution en pointillé de la protéine dans le cytoplasme (Zhu 2012 ; Rendón 2013). Cependant dans les cellules surexprimant l' α -synucléine, des points riches en α -synucléine apparaissent en abondance autour des noyaux, donc cette protéine s'agglomère autour du noyau avec des spots d'une très forte intensité (figure 7B.14 c, f).

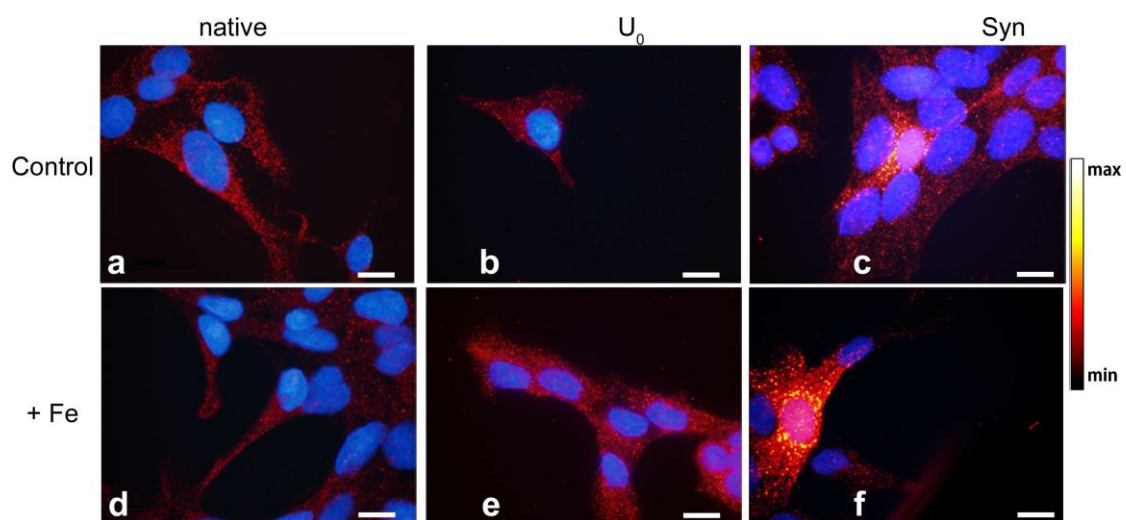


Figure 7B.14. Images d'immunofluorescence de l' α -synucléine (en rouge) sur des cellules PC12 et marquage du noyau avec Hoechst 33342 (en bleu). a) Cellules PC12 natives ; b) Cellules infectées par le vecteur adénovirus vide U_0 ; c) Cellules infectées par l'adénovirus α -synucléine ; d) Cellules natives exposées au fer ; e) Cellules infectées par le vecteur adénovirus vide et exposée au fer ; f) Infectées par l'adénovirus α -synucléine et exposées au fer. Barres d'échelle 20 μ m (Ortega 2016).

Les échantillons préparés pour l'analyse par fluorescence des rayons X ont été cryofixés et lyophilisés et nous les avons analysés à AIFIRA pour quantifier les éléments chimiques (notamment le fer) selon les conditions d'exposition et nous les avons aussi analysés à la ligne ID22NI du synchrotron ESRF pour déterminer la localisation des éléments en fonction des expositions. Le S et le Zn, ici montrés dans la figure 7B.15, mais aussi le P, Cl, K et Ca étaient distribués de manière assez homogène dans les cellules, et n'ont pas été modifiés par les expositions au fer ou suite à la surexpression de l' α -synucléine. Les cellules exposées à l'adénovirus vide et au fer (U_0 +Fe) montrent le fer distribué sous forme de petits spots partout dans le cytoplasme (figure 7B.15). En revanche, les cellules surexprimant l' α -synucléine et exposées au fer (Syn+Fe) montrent le fer redistribué sous forme de gros grains autour du noyau (figure 7B.15). Cette distribution du fer ressemble à la distribution de l' α -synucléine obtenue par immunofluorescence (figure 7B.14) et, de plus, la redistribution apparaît lorsque l' α -synucléine et le fer sont en excès tous les deux. Ces résultats suggèrent une relocalisation du fer par effet de l' α -synucléine, et que le fer se relocalise dans les inclusions riches en α -synucléine.

La quantification des éléments chimiques montre que, quand les cellules sont exposées à un excès du fer dans le milieu de culture, cet élément s'accumule de manière significative dans les cellules qui surexpriment l' α -synucléine (Syn+Fe) par rapport aux cellules témoins, transfectées avec un adénovirus vide (U_0 +Fe) (figure 7B.16). Lorsqu'il n'y a pas d'excès de fer extracellulaire, cet élément se trouve en même quantité dans les cellules qui surexpriment l' α -synucléine (Syn) par rapport aux cellules témoins, transfectées avec un adénovirus vide (U_0) (figure 7B.16). Pour les autres éléments quantifiés K, Ca, Cu or Zn aucune différence significative n'a été mesurée selon les différentes expositions. Ainsi, nous montrons avec la fluorescence des rayons X que, dans les cellules exposées à un excès de fer, la simple surexpression de l' α -synucléine entraîne une augmentation des niveaux de fer intracellulaire et une redistribution du fer du cytoplasme vers la région périnucléaire au sein de ce qui semble être des inclusions riches en α -synucléine. Nos résultats établissent un lien entre deux caractéristiques moléculaires de la maladie de Parkinson, à savoir l'agrégation de l' α -synucléine et l'augmentation du taux de fer.

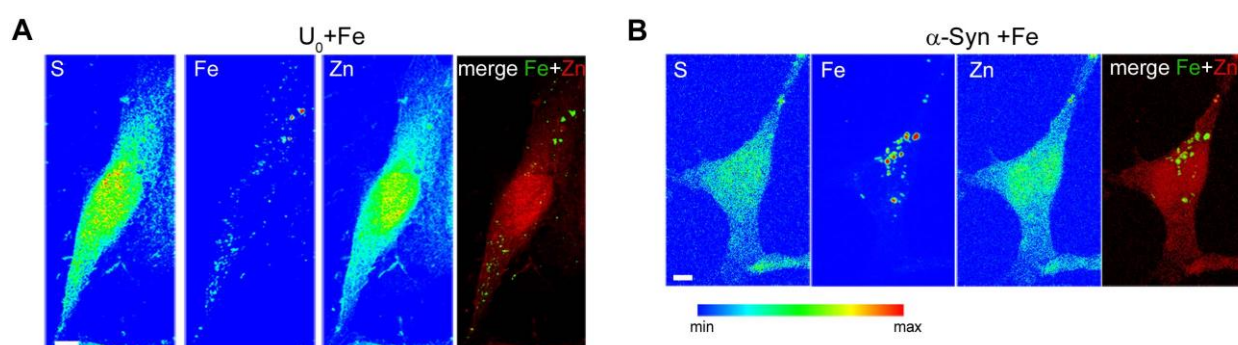


Figure 7B.15. Imagerie par nano-SXRF de la distribution des éléments chimiques dans : A) Cellule PC12 exposée au vecteur vide et un excès de Fe (U_0 +Fe) et B) Cellule PC12 surexprimant la protéine α -synucléine et exposée à un excès de Fe (α -Syn+Fe). Barres d'échelle 5 μ m. Images obtenues sur la ligne ID22NI de l'ESRF (Ortega 2016).

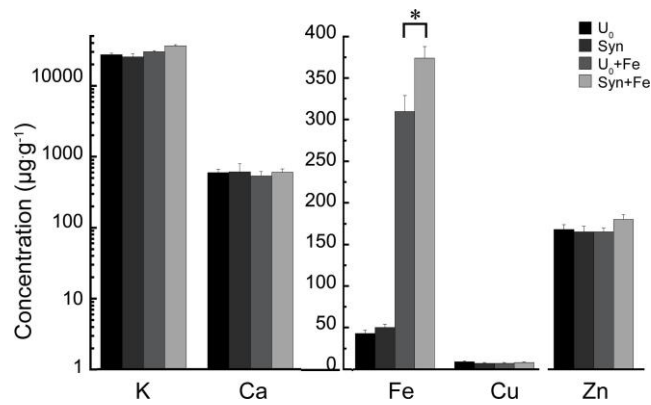


Figure 7B.16. Quantification des éléments intracellulaires déterminée par la combinaison de micro-PIXE et de micro-RBS à AIFIRA et exprimée en microgrammes d'élément par gramme de masse sèche. Les concentrations sont présentées comme la moyenne et l'erreur-type de la moyenne pour « n » mesures. Chaque analyse a été effectuée sur des zones d'environ $200 \times 200 \mu\text{m}^2$, contenant 10 à 18 cellules. Les différences significatives sont indiquées par * $0,01 < P < 0,05$ (Ortega 2016).

c. Fe et *Lewy bodys* dans des tissus humains

Précédemment, nous avons montré que le fer semble s'accumuler avec l' α -synucléine dans des cultures cellulaires, et il est connu que les LBs sont composés principalement d' α -synucléine. Pour approfondir sur le rôle du fer dans la maladie du Parkinson et toujours en collaboration avec Paul Lingor de l'Université de médecine de Göttingen, nous avons décidé d'étudier la composition des LBs dans des tissus humains. Nous avons fait une demande à l'UK Brain Bank pour avoir accès à la *substantia nigra* (SN) de personnes décédées de la maladie du Parkinson pour étudier si les corps de Lewy fixent le fer ou autres métaux (article en cours de rédaction).

La neuromélanine (NM) est un pigment foncé qui est surtout présent dans les neurones catécholaminergiques situés dans la SN. Chimiquement, la NM est un sous-produit du métabolisme de la dopamine qui s'accumule naturellement avec l'âge et représente un agrégat complexe ayant la capacité de se lier au Fe, réduisant ainsi les niveaux de stress oxydatif dans les neurones (Zucca 2017). Ainsi, dans un premier temps, notre objectif était de comparer la composition élémentaire (P, S, Cl, K, Fe, Cu et Zn) des neurones à neuromélanine (*NM-neurons*) et la composition des corps de Lewy (LB) dans la *substantia nigra* de tissus de cerveau humain parkinsonien post-mortem. Pour la détermination de ses structures et quantification des éléments, nous avons suivi le protocole d'analyse corrélative expliqué dans la partie B section 6.2 et combiné aux techniques de micro-PIXE/RBS à AIFIRA (émission de rayons X induite par les particules et spectrométrie de rétrodiffusion de Rutherford).

L'UK Brain Bank nous a fourni des tissus de la *substantia nigra* de cerveaux cryofixés provenant de patients décédés de la MP et de personnes non atteintes de la maladie. Comme expliqué dans le protocole d'imagerie corrélative, nous avons monté les tissus (déjà cryofixés) de la SN dans le cryomicrotome et percé quelques trous d'épingle pour la phase de repérage, après quoi nous avons procédé à la réalisation des coupes consécutives. La première section a été colorée par histochimie avec de l'hématoxyline-éosine (H&E) et la section adjacente a été laissée non colorée (native) pour les analyses PIXE/RBS. Nous avons identifié les

agrégats de corps de Lewy dans la section colorée et par superposition nous avons déterminé la position de ces agrégats dans la coupe native. Nous avons analysé plusieurs corps de Lewy, des neurones et des tissus adjacents pour les différents patients. Nous avons pu clairement mettre en évidence la non-modification du Fe, Cu ou d'autres éléments dans les neurones à neuromélanine par rapport aux corps de Lewy, ce qui suggère que les LB ne jouent pas un rôle de promoteur de la maladie en raison d'une dysrégulation du contenu métallique dans le cerveau (figure 7B.17).

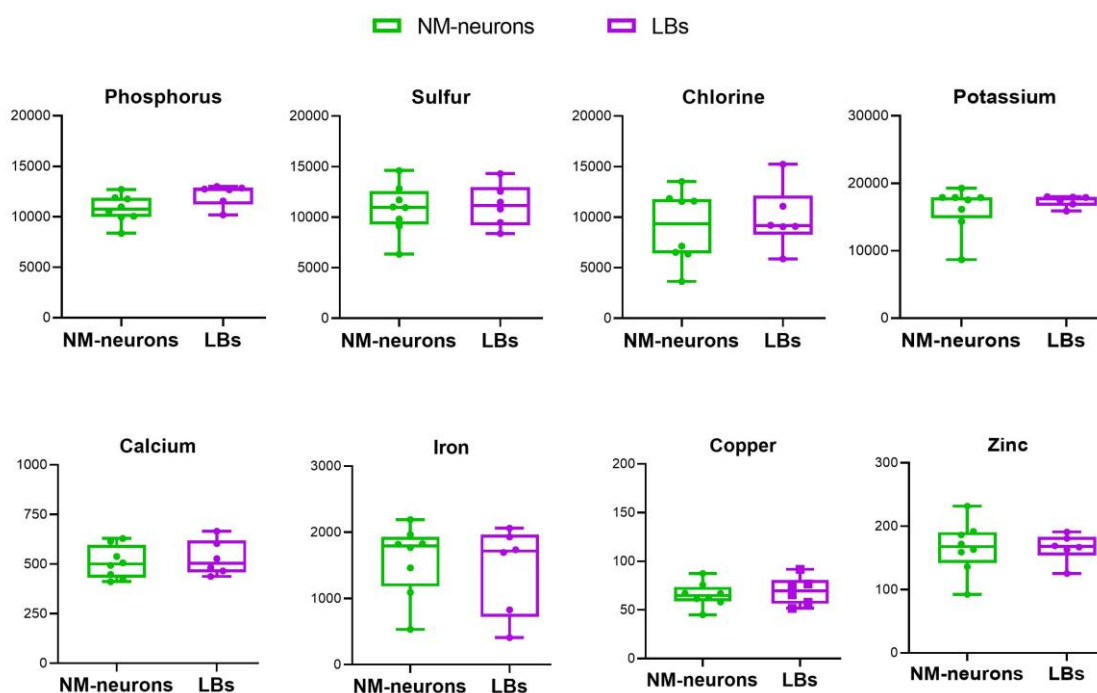


Figure 7B.17. Contenu élémentaire dans des neurones à neuromélanine (NM-neurons) et de corps de Lewy (LB) provenant de tissus des personnes décédées de la maladie du Parkinson. Les axes Y représentent le contenu élémentaire exprimé en µg d'élément/g d'échantillon sec. Les box-plot montrent la valeur moyenne pour chaque groupe, les valeurs individuelles, maximum et minimum, ainsi que les écarts-types à 25 et 75 %. Quantification faite à AIFIRA, article en préparation.

En complément de ces résultats et suivant le même protocole de préparation des échantillons, nous avons comparé aussi le contenu métallique dans les neurones à neuromélanine et le tissu extraneuronal dans la *substantia nigra* de personnes atteintes de la maladie de Parkinson (n = 8), de sclérose en plaques (SEP) (n = 7) et d'individus témoins (n = 3). La sclérose en plaques (*MS : multiple sclerosis* en anglais) est aussi une maladie neurodégénérative où le fer est modifié (Jellinger 2013; Stankiewicz 2014; Stephenson 2014; Popesku 2017). Comme l'illustre la figure 7B.18, les neurones à NM (vert) présentaient des concentrations moyennes de Fe significativement plus élevées dans la MP et la SEP que dans les contrôles. Dans le tissu périneuronal (magenta) la teneur en Fe est significativement plus élevée dans la MP par rapport aux témoins, et le contenu en fer semble être plus élevé dans la SEP que dans les témoins, mais la différence n'est pas significative. Il est intéressant de noter que les concentrations en Cu montrent une tendance inverse au fer, avec des valeurs plus faibles dans le groupe PD par rapport aux échantillons SEP ou témoins, à la fois dans le tissu périneuronal et dans les neurones à NM.

Si nous nous intéressons à la variabilité interindividuelle dans la composition des éléments chimiques des neurones à NM et du tissu périneuronal au sein d'une même maladie nous avons obtenu aussi quelques différences remarquables (figure 7B.19). Un patient PD (PD029) présente une teneur en Fe beaucoup plus faible dans les neurones à NM que tous les autres patients. Et quatre patients atteints de la maladie de Parkinson présentent une faible teneur en Fe dans le tissu périneuronal (PD029, PD074, PD153 et PD268) par rapport aux cinq autres patients atteints du PD (figure 7B.19). Pour la SEP, la variabilité interindividuelle du Fe dans les neurones NM est encore plus importante, avec 3 patients sur 7 avec une teneur faible en Fe dans les neurones NM et avec 4 patients sur 7 avec une teneur faible en Fe dans le tissu périneuronal (figure 7B.19). Le contenu en cuivre, par exemple, présente moins de variations interpatients, avec seulement 1 patient SEP avec un faible contenu par rapport aux autres, mais pour ce patient une seule mesure avait été faite.

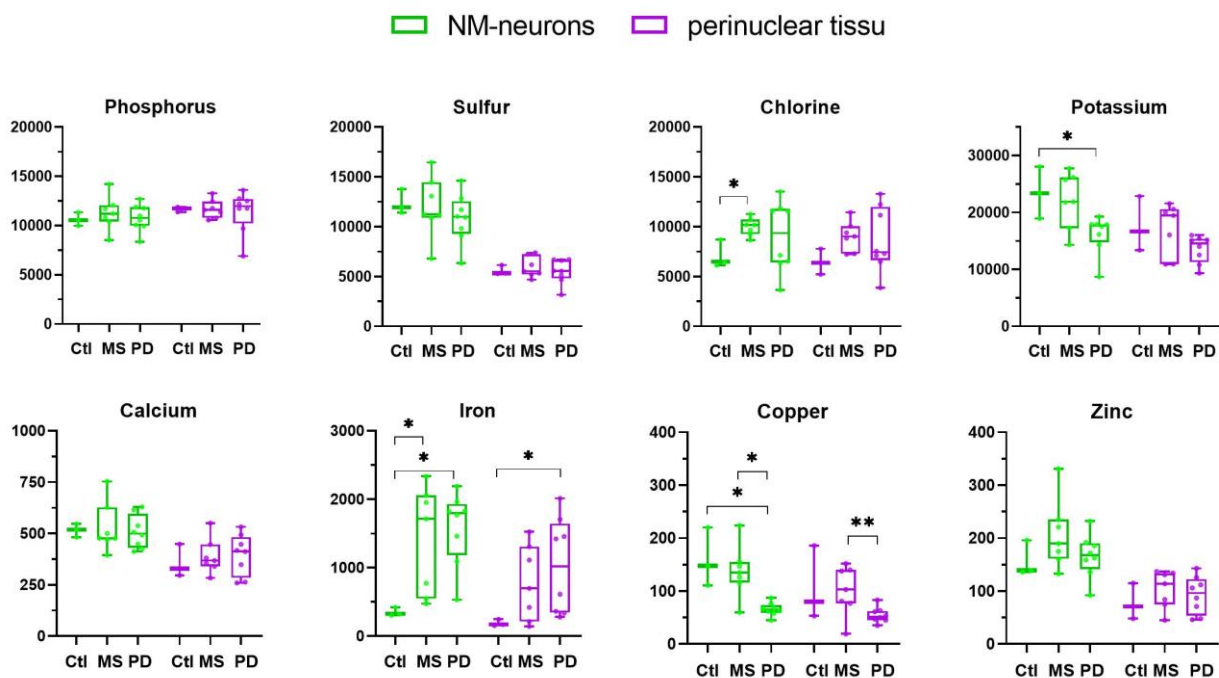


Figure 7B.18. Contenu en éléments dans les neurones à NM et du tissu périneuronal par groupe de maladies. Diagrammes en boîtes à moustaches montrant les valeurs médianes, les intervalles interquartiles, les valeurs minimales et maximales et les mesures individuelles de chaque groupe. Les valeurs p utilisant le test de Mann-Whitney indiquent les différences statistiquement significatives * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Quantification faite à AIFIRA, article en préparation.

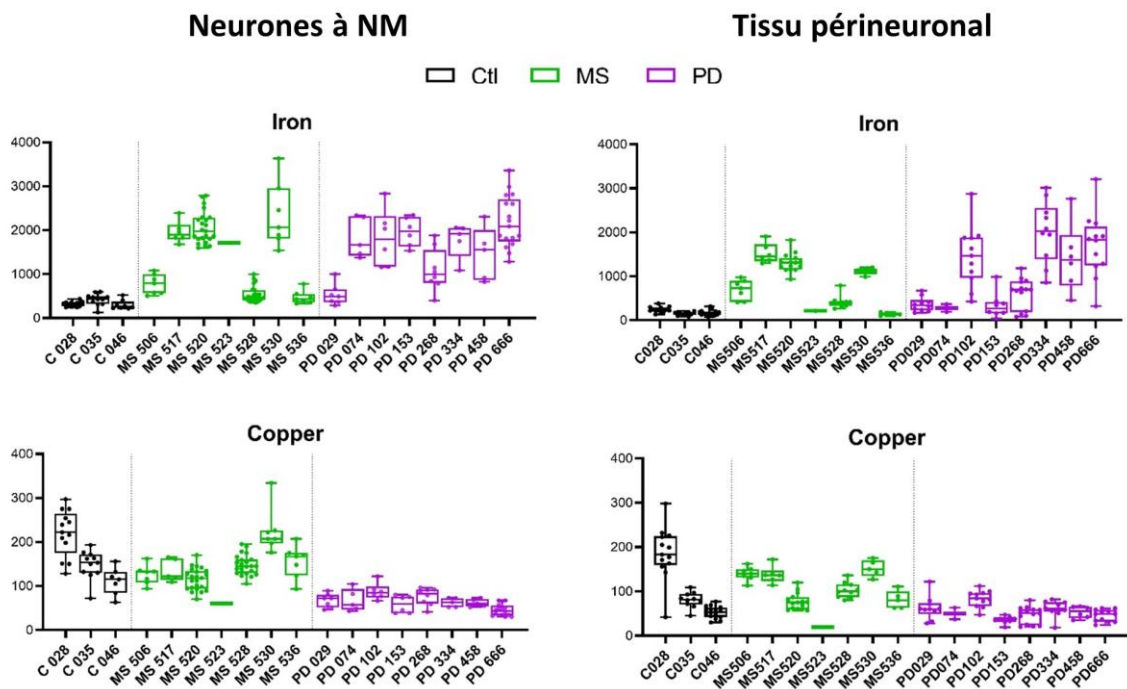


Figure 7B.19. Contenu élémentaire (exprimé en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) dans les neurones à NM et le tissu péri-neuronal de chaque patient. Diagrammes en boîtes à moustaches montrant les valeurs médianes, interquartiles, minimales et maximales ainsi que les mesures individuelles quantifiées par PIXE/RBS à AIFIRA, article en préparation.

7.3 Neurotoxicité de l'uranium naturel

Nous travaillons depuis quelques années en collaboration avec la docteure Carole Bresson du CEA à l'Université Paris-Saclay et avec la docteure Véronique Malard de l'Institut de biosciences et biotechnologies du CEA du Marcoule, sur la toxicité de certains métaux de l'industrie nucléaire. Nous avons étudié le cobalt et l'uranium naturels puisque les travailleurs des centrales peuvent être accidentellement exposés à ces métaux qui s'avèrent potentiellement cancérigènes ou neurotoxiques. J'ai déjà parlé de la toxicité du cobalt dans la partie B section 2.3, ainsi, ici, je vais exposer nos récentes recherches sur la neurotoxicité de l'uranium naturel. Chez l'animal, quelle que soit la voie d'exposition, une faible quantité d'uranium atteignant le cerveau est associée à certains effets neurologiques comme la perturbation du système dopaminergique (Bussy 2006 ; Barber 2007 ; Briner 2008 ; Bensoussan 2009 ; Dinocourt 2015). De tels effets neurologiques, voire neurotoxiques, sont également suspectés chez l'homme et représentent une problématique émergente. Le but de ce projet était d'apporter des éléments de compréhension sur les mécanismes de perturbation induits par des faibles concentrations d'U naturel, sur un modèle cellulaire neuronal humain (lignée SH-SY5Y). Sa distribution dans les organites cellulaires, son impact sur l'homéostasie des métaux traces essentiels endogènes, et les protéines intracellulaires auxquelles il est lié, ont été identifiés. Premièrement, la viabilité des cellules a été évaluée (figure 7B.20), montrant que la cytotoxicité de l'uranium s'est seulement produite à des concentrations d'exposition élevées ($> 125 \mu\text{M}$), loin des valeurs attendues pour l'uranium dans le sang, même après une exposition professionnelle.

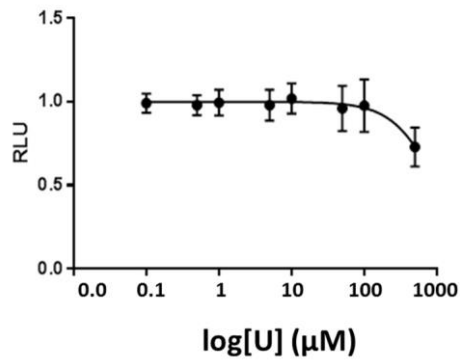


Figure 7B.20. Courbe de cytotoxicité de l'ATP après 7 jours d'exposition continue de cellules SH-SY5Y différenciées à l'uranium naturel (RLU : relative luminescence units) (Carmona 2018).

a. Imagerie PIXE de l'uranium

Les cellules différenciées SH-SY5Y ont ensuite été exposées en continu à 1, 10, 125 ou 250 μM d'uranium naturel pendant 7 jours, et la distribution subcellulaire quantitative de l'uranium a été étudiée par des moyens de micro-PIXE (émission de rayons X induite par des particules). Dans un premier temps, nous avons trouvé que l'uranium était situé dans des régions périnucléaires définies du cytoplasme, ce qui suggérait son accumulation dans des organites et que la distribution était semblable à celle de l'appareil de Golgi (figure 7B.21). Nous avons décidé d'exposer les cellules à la BFA, un composé qui entraîne une perturbation de l'appareil de Golgi. Comme l'illustre la figure 7B.22, l'exposition à la BFA entraîne une large distribution cytoplasmique du marquage Golgi-GFP, mais l'uranium est resté localisé dans une région étroite du cytoplasme (figure 7B.22). Ce résultat indique fortement que l'appareil de Golgi n'est pas le principal organite d'accumulation de l'uranium dans les cellules. L'uranium n'a pas été détecté dans le noyau des cellules différenciées. L'analyse quantitative a mis en évidence une très faible concentration intracellulaire d'uranium à des niveaux d'exposition non cytotoxiques (10 μM). À des niveaux d'exposition plus élevés (125 et 250 μM), lorsque les effets cytotoxiques commencent, une accumulation intracellulaire d'uranium plus importante et disproportionnée a été observée (figure 7B.23) (Carmona 2018).

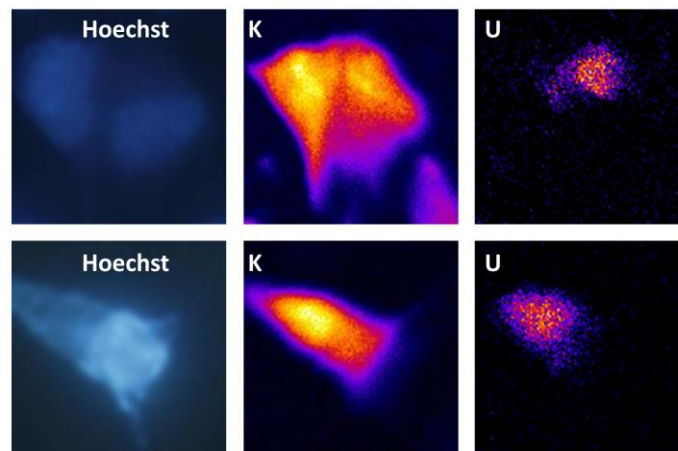


Figure 7B.21. Distribution intracellulaire de K et U dans des cellules exposées à 125 μM (haut) et à 250 μM (bas) d'uranium pendant 7 jours. Nous observons que l'uranium est d'un côté du noyau (noyau marqué avec le Hoechst en bleu). Imagerie PIXE obtenue à AIFIRA (Carmona 2018).

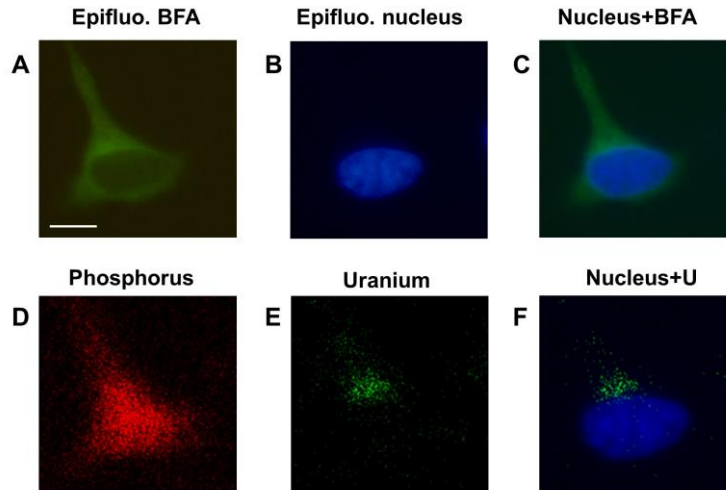


Figure 7B.22. Microscopie optique et imagerie micro-PIXE d'une cellule SHSY5Y après une exposition continue de 7 jours à 125 μM d'uranium et 4 heures d'exposition à la BFA (brefeldin A). (A) Microscopie à épifluorescence de Golgi-GFP montrant la perturbation de l'appareil de Golgi induite par la BFA avec l'appareil de Golgi répandue dans tout le cytoplasme. (B) Microscopie optique à épifluorescence de Hoechst 33342. (C) Superposition des images du noyau et du Golgi. (D) Distribution du potassium. (E) Répartition de l'uranium. (F) Images superposées du noyau et de la distribution de l'uranium. Imagerie PIXE obtenue à AIFIRA (Carmona 2018).

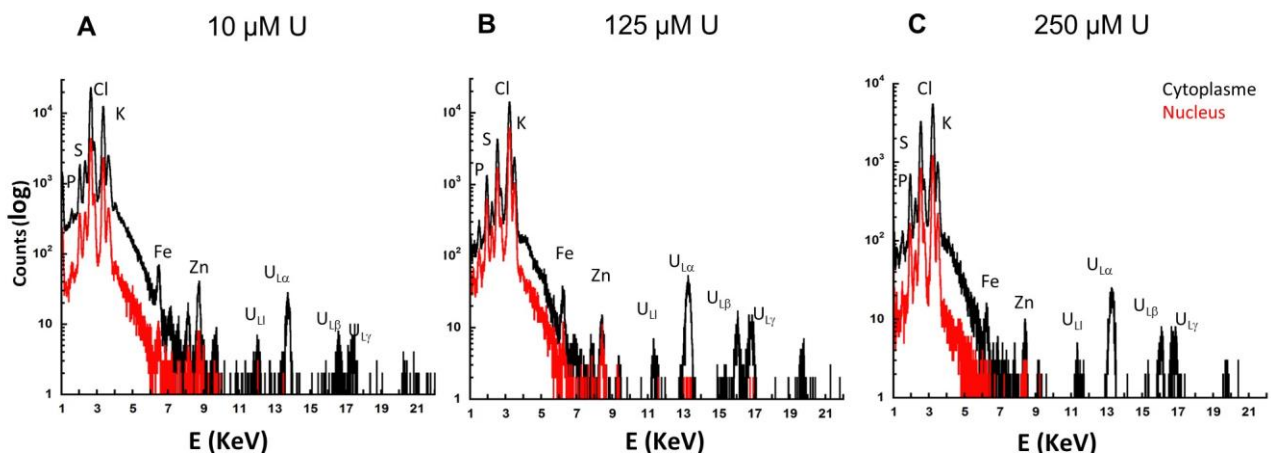


Figure 7B.23. Spectres PIXE obtenus à AIFIRA à différentes conditions d'exposition d'uranium. Nous observons qu'il n'y a pas d'uranium dans le noyau (spectre rouge) dans aucune des conditions d'exposition (Carmona 2018).

D'un autre côté, l'expression des gènes liés à la dopamine a été quantifiée en utilisant la qRT-PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction). Le site d'expression du gène de la monoamine-oxydase B (MAO-B) a diminué de manière statistiquement significative après l'exposition à l'uranium alors que d'autres gènes liés à la dopamine n'ont pas été modifiés. La dérégulation de l'expression de la MAO-B a été confirmée au niveau des protéines. Ce résultat original suggère que l'inhibition du catabolisme de la

dopamine, mais aussi d'autres substrats MAO-B, pourrait constituer des effets sélectifs de la neurotoxicité de l'uranium (figure 7B.24) (Carmona 2018).

Gene	Name	Function	U 10 μ M	U 125 μ M	U 250 μ M
DDC	Dopa decarboxylase	Biosynthesis of dopamine	-1.2	1	1.4
DRD1	D1 subunit of dopamine receptor	Dopamine receptor	-3.2	1.1	-1.5
DRD3	D3 subunit of dopamine receptor	Dopamine receptor	ND	ND	ND
MAOB	Monoamine oxidase B	Catabolism of monoamines	-1.8*	-4.1*	-5.1*
SLC18A2 / VMAT2	VMAT2 Vesicular Monoamine Transporter 2	Transport of monoamines neurotransmitters	1.3	1.4	1.4
SLC6A3 / DAT	DAT Dopamine transporter	Dopamine transport	ND	ND	ND
TH	Tyrosine hydroxylase	Biosynthesis of dopamine	-3.7*	-1.2	-3.1

Figure 7B.24. Analyse par RT-qRT-PCR de l'expression des gènes liés à la dopamine dans des cellules SHSY-5Y différenciées après une exposition continue de 7 jours à 10, 125 et 250 μ M d'uranium naturel. L'expression des gènes a été comparée au témoin non traité correspondant. Les niveaux d'expression du gène cible ont été normalisés au niveau d'expression des gènes ACTB (bêta-actine) et GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). * p -value < 0,05 ; ND : non détecté (Carmona 2018).

b. Imagerie corrélative SXRF et épifluorescence des organites

Nous avons entrepris des études supplémentaires pour identifier les organites d'accumulation de l'uranium. Cette fois-ci nous avons étudié la localisation intracellulaire de l'uranium au moyen de la fluorescence X induite par radiation synchrotron qui nous permet d'attendre une très haute résolution spatiale (< 300 nm) et une haute sensibilité analytique (< 1 μ g·g⁻¹ par pixel de 300 nm). Des cellules humaines SH-SY5Y différenciées en un phénotype dopaminergique de type neuronal ont été exposées en continu pendant 7 jours à une concentration non cytotoxique (10 μ M) d'uranyle naturel soluble. Même à des concentrations non cytotoxiques, des agrégats cytoplasmiques d'uranium submicronique ont été observés, représentant en moyenne 62 % de la teneur en uranium intracellulaire. Les agrégats d'uranium ne contenaient ni calcium ni phosphore, ce qui indique que les mécanismes de détoxification dans les cellules de type neuronal sont différents de ceux décrits dans les cellules osseuses ou rénales (Keith 2008 ; Boonrungsiman 2012). Dans certains agrégats, l'uranium et le fer ont été colocalisés, ce qui suggère des voies métaboliques communes entre le stockage de l'uranium et du fer. Le fer est le seul élément qui se distribue sous forme de granules et qui présente une colocalisation partielle avec l'uranium (figure 7B.25) (Carmona 2021).

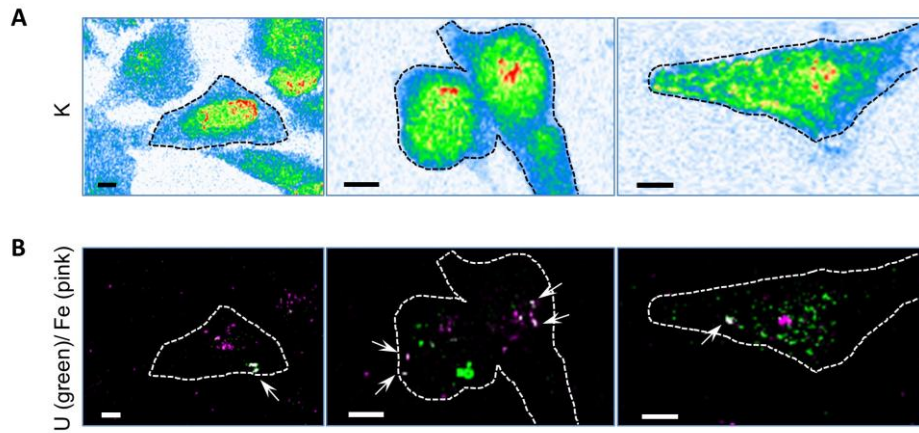


Figure 7B.25. Colocalisation partielle de l'uranium et du fer dans les cellules SH5Y-SY. A) Cartes élémentaires du potassium, les limites des cellules sont tracées avec une ligne noire en pointillé. B) Images fusionnées de l'uranium (vert) et du fer (magenta), et les limites des cellules (pointillés blancs). La colocalisation du fer et de l'uranium est révélée par la couleur blanche des images fusionnées et mise en évidence par des flèches blanches. Barres d'échelle : 5 μ m. Analyses effectuées sur la ligne Nanoscopium à SOLEIL (Carmona 2021).

La distribution intracellulaire de l'uranium a été comparée à la distribution des organites marqués par fluorescence (lysosomes, endosomes précoces et tardifs) et à la féтуine-A, une protéine de haute affinité pour l'uranium. Une corrélation stricte n'a pas pu être mise en évidence entre l'uranium et les organites marqués (figure 7B.26, figure 7B.27), ou avec les vésicules contenant la féтуine-A (figure 7B.28). Nos résultats indiquent un nouveau mécanisme d'agrégation cytoplasmique de l'uranium après une exposition à l'uranyle non cytotoxique. Ce mécanisme d'agrégation pourrait être impliqué dans la défense neuronale des cellules par séquestration de l'uranium dans des espèces moins réactives.

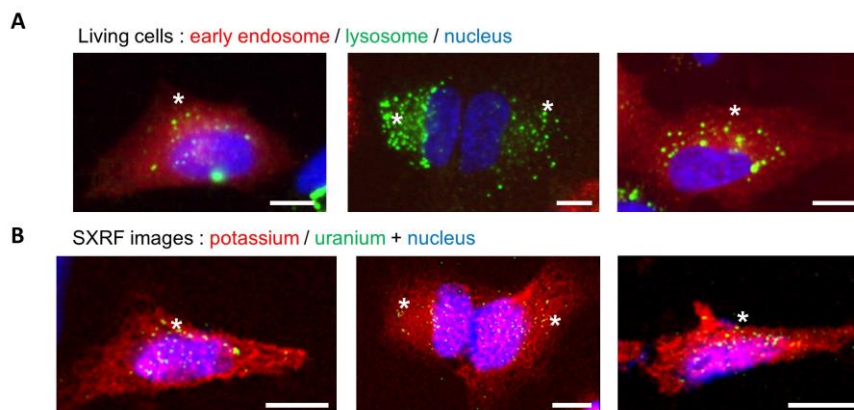


Figure 7B.26. Distribution de l'uranium et comparaison avec la localisation du noyau, lysosome et endosome précoce. A) Imagerie par microscopie de fluorescence sur cellules vivantes de l'endosome précoce (rouge), le lysosome (vert) et le noyau (bleu). B) L'imagerie SXRF, sur la ligne Nanoscopium à SOLEIL, de potassium (rouge) et uranium (vert) superposés avec l'imagerie de fluorescence du noyau (bleu) après lyophilisation (mêmes cellules présentées en A). Les astérisques blancs indiquent la présence d'agrégats d'uranium dans les zones cytoplasmiques où la fluorescence des lysosomes est dense. Barres d'échelle : 10 μ m (Carmona 2021).

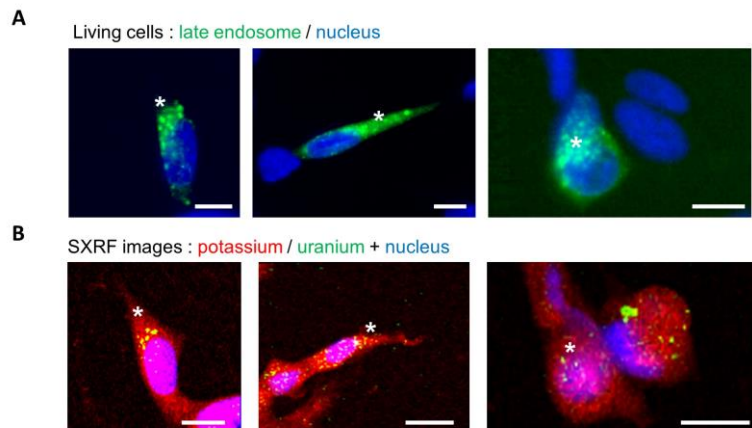


Figure 7B.27. Distribution de l'uranium et comparaison avec la localisation du noyau et l'endosome tardif. A) Imagerie par microscopie de fluorescence sur cellules vivantes de l'endosome tardif (vert) et de noyau (bleu). B) L'imagerie SXRf, sur la ligne Nanoscopium à SOLEIL, de potassium (rouge) et uranium (vert) superposés avec l'imagerie de fluorescence du noyau (bleu) après lyophilisation (mêmes cellules présentées en A). Les astérisques blancs indiquent la présence d'agrégats d'uranium dans les zones cytoplasmiques où la fluorescence des endosomes tardifs est dense. Barres d'échelle : 10 μ m (Carmona 2021).

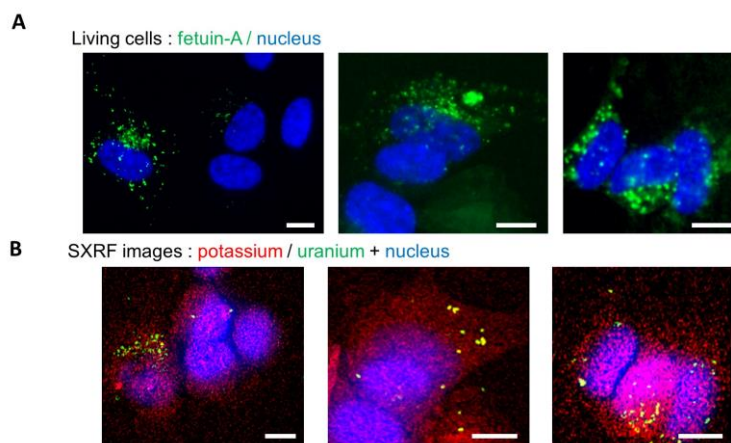


Figure 7B.28. Distribution de l'uranium et comparaison avec la localisation de la fétuine-A. A) Imagerie par microscopie de fluorescence sur cellules vivantes de la fétuine-A marquées avec Alexia-488 (vert) et de noyau (bleu). B) L'imagerie SXRf, sur la ligne Nanoscopium à SOLEIL, de potassium (rouge) et uranium (vert) superposés avec l'imagerie de fluorescence du noyau (bleu) après lyophilisation (mêmes cellules présentées en A). Barres d'échelle : 10 μ m (Carmona 2021).

En conclusion, nous avons révélé l'altération de la voie de dégradation des monoamines dans des cellules dopaminergiques après exposition continue à des concentrations d'uranium non cytotoxiques. Nous avons également cartographié la distribution de l'uranium en utilisant l'imagerie PIXE, avec une résolution micrométrique, et nous avons signalé la présence d'uranium dans les régions cytoplasmiques. Grâce à l'excellente sensibilité et à la résolution spatiale de la technique SXRf, nous avons exposé des cellules de type neuronal à 10 μ M d'uranyle, et nous avons révélé la formation d'agrégats submicroniques d'uranium dans le cytoplasme qui ne pouvait pas être observée auparavant.

En outre, nous avons mis en évidence la colocalisation du fer et de l'uranium dans certains agrégats. Ce résultat suggère une potentielle interaction de l'uranium avec les protéines de stockage du fer intracellulaire telles que la ferritine, une protéine cytosolique dont il a été démontré qu'elle séquestrerait l'uranyle dans les essais biochimiques. Cependant, comme seulement une petite fraction des agrégats d'uranium contenait du fer, une interaction directe de l'uranium avec la protéine de stockage du fer ne peut pas expliquer tout le mécanisme d'agrégation de l'uranium. Nous avons également exploré d'autres hypothèses pour identifier la nature de l'uranium en comparant la distribution de l'uranium avec celle des autres organelles vésiculaires (lysosomes, endosomes précoces et tardifs) et avec des vésicules contenant la fétuine-A. Nos résultats ne suggèrent pas une colocalisation stricte de l'uranium par la voie endo-lysosomale ou avec des vésicules contenant la fétuine-A. Il est probable que les agrégats d'uranium se forment directement dans le cytosol des neurones SH-SY5Y. Nous proposons que l'agrégation de l'uranium puisse être un mécanisme de défense cellulaire contre la neurotoxicité de l'uranyle, et commence à des faibles niveaux d'exposition continue à l'uranyle, ce qui entraîne la séquestration de l'uranium dans des espèces moins réactives. La fraction soluble restante de l'uranium serait responsable de la complexation avec les protéines et des effets neurotoxiques qui en résultent (Carmona 2021).

7.4 Cu et Zn et le cytosquelette neuronal

Le zinc et le cuivre sont impliqués dans la différenciation neuronale et la plasticité synaptique, mais les mécanismes moléculaires à l'origine de ces processus sont encore insaisissables, en partie en raison de la difficulté à imager ses métaux à l'état de traces (Chang 2015 ; Vergano 2014 ; Barr 2017 ; D'Ambrosi 2015 ; Xiao 2018 ; Hatori 2016). Les ions de zinc sont stockés dans des vésicules présynaptiques dans un sous-ensemble de neuro-alvéoles glutamatergiques et ils sont libérés dans la fente synaptique lors de la neurotransmission (Vergnano 2014 ; Barr 2017). Le rôle du cuivre dans la fonction neuronale est moins bien décrit que celui du zinc, mais on sait que des ions de cuivre sont également libérés dans la fente synaptique où ils peuvent moduler l'activité des récepteurs de neurotransmetteurs (D'Ambrosi 2015). Cependant, les ions labiles de ces éléments ne représentent probablement que la partie émergée de l'iceberg, d'autres fonctions neuronales sont suspectées d'être liées à ces métaux.

a. Premières indications de l'interaction du Cu et du Zn avec le cytosquelette neuronal

Nous avons pu quantifier le contenu de cuivre dans des tissus humains, et nous avons mis en évidence que dans la substance noire des patients atteints de la maladie du Parkinson, il y a un détriment du cuivre par rapport à des sujets témoins (Davies 2014). Au niveau de la cellule, le cuivre est un élément très peu concentré dans le corps cellulaire, mais nous avons remarqué qu'il se localise spécifiquement dans des dendrites très fines des cellules différenciées en neurones (Carmona 2008 b). Et que dans certaines structures il était, avec le zinc, le composé majoritaire (figure 7B.29 et figure 7B.30).

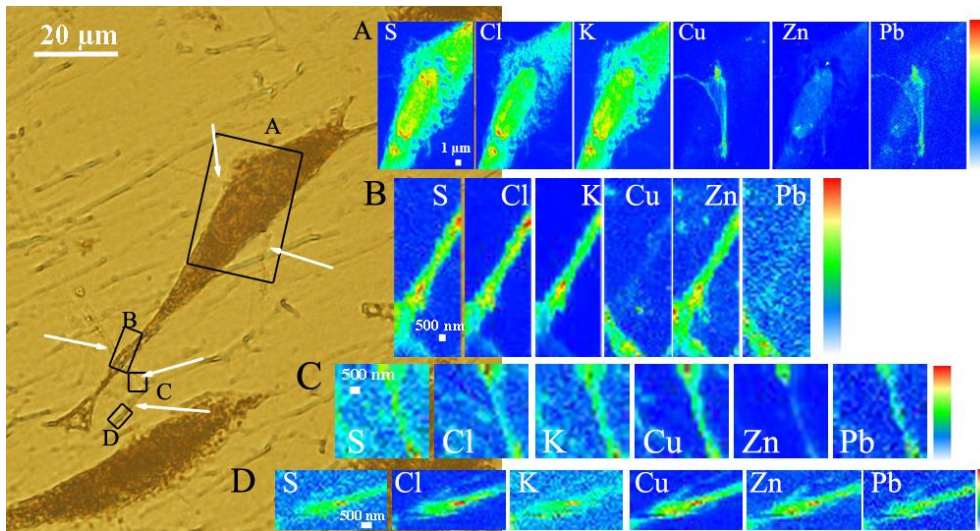


Figure 7B.29. Gauche : image optique des cellules PC12 après cryofixation et lyophilisation. Les cellules ont été cultivées avec 300 µM de fer pendant 24 heures et traitées au NGF (nerve growth factor) pour les différencier. Les carrés noirs montrent les zones analysées par fluorescence des rayons X synchrotron sur la ligne ID22NI de l'ESRF. Les flèches blanches montrent les processus de type neurite fin. À droite : images par fluorescence des rayons X des éléments chimiques dans le corps cellulaire (A), la ramification principale (B) et dans les processus de type neurite fin (A, B, C, D) (Carmona 2008 b).

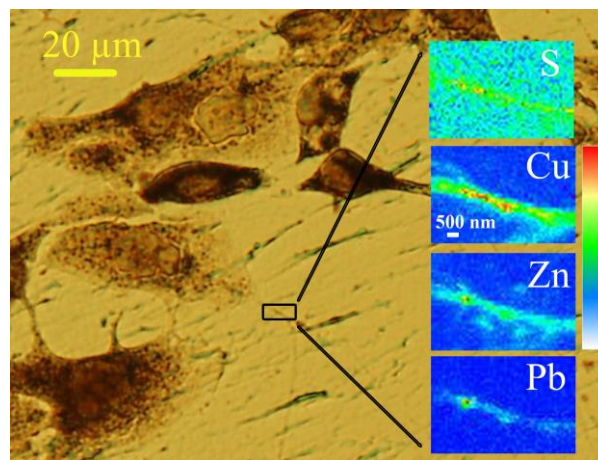


Figure 7B.30. Gauche : image optique d'une cellule PC12 après cryofixation et lyophilisation, cultivée en conditions de contrôle et traitée au NGF. Le carré noir montre la zone analysée par SXRF. À droite : images par fluorescence des rayons X sur la ligne ID22NI de l'ESRF des éléments chimiques dans un processus de type neurite fin. Le processus mince est riche en cuivre, en zinc et, dans une moindre mesure, en soufre et en plomb (Carmona 2008 b).

b. Imagerie SXRF de neurones primaires

Après ces étonnants résultats, nous avons travaillé avec des neurones primaires de l'hippocampe du rat. Les neurones avaient été maintenus en culture pendant 21 jours pour leur permettre de développer des connexions synaptiques. Pour l'identification des épines, le premier jour, avant d'ensemencer les cellules, elles ont été électroporées avec des protéines fluorescentes (FingPSD-95 GFP) qui ciblent la protéine PSD95 endogène de la densité post-synaptique. Ce marquage avait comme objectif de vérifier que les neurones avaient bien développé les synapses après ces 21 jours de culture. Le contenu synaptique a été analysé par SXRF sur ID16NI à l'ESRF avec un faisceau focalisé à $21 \text{ nm} \times 38 \text{ nm}$ et nous avons mis en évidence que le Zn, Ca, P, S et K sont présents dans toute l'épine dendritique, avec une proportion plus élevée à la tête de celle-ci, figure 7B.31. En revanche le Cu n'affichait qu'une colocalisation partielle avec ces éléments, il est spécifiquement situé dans le cou de l'épine et non dans la tête, comme on peut le voir sur les images de superposition (figure 7B.31).

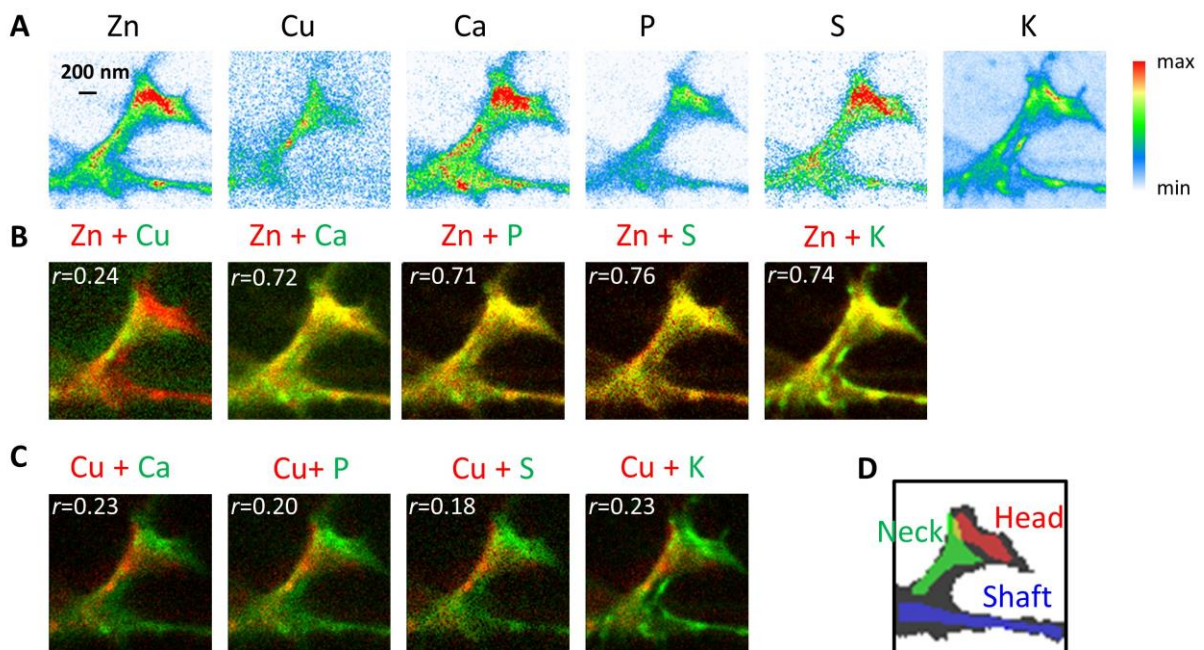


Figure 7B.31. Répartition des éléments dans les épines dendritiques (ou compartiments post-synaptiques). (A) Images nano-SXRF sur la ligne ID16-NI de l'ESRF des distributions de Zn, Cu, Ca, P, S et K dans l'ensemble d'une épine dendritique provenant d'un neurone de l'hippocampe de rat. (B et C) Superposition d'images nano-SXRF et coefficient de corrélation de Pearson (r). (D) Délimitation schématique des zones synaptiques ; toute la région d'intérêt (roi) est en gris, le roi pour la tête en rouge, le roi pour le cou en vert, et le roi pour la tige dendritique en bleu (Perrin 2017).

Dans des zones plus larges, figure 7B.32, nous apprécions que le cuivre et le zinc forment des points d'accumulation, nous pensons qu'ils sont très concentrés dans les épines et qu'ils sont en forte relation avec des protéines du cytosquelette synaptique, comme l'actine ou la tubuline. Toujours sur la figure 7B.32, nous apprécions, sur l'image de superposition, que la distribution du Cu est co-ségrégée à celle du zinc. Nous avons quantifié le contenu élémentaire dans les corps neuronaux et dans les dendrites avec la plateforme AIFIRA,

et nous avons confirmé que la plupart du cuivre se retrouve dans la partie dendritique, mais le zinc se retrouve partout dans la cellule (Figure 7B.32 B).

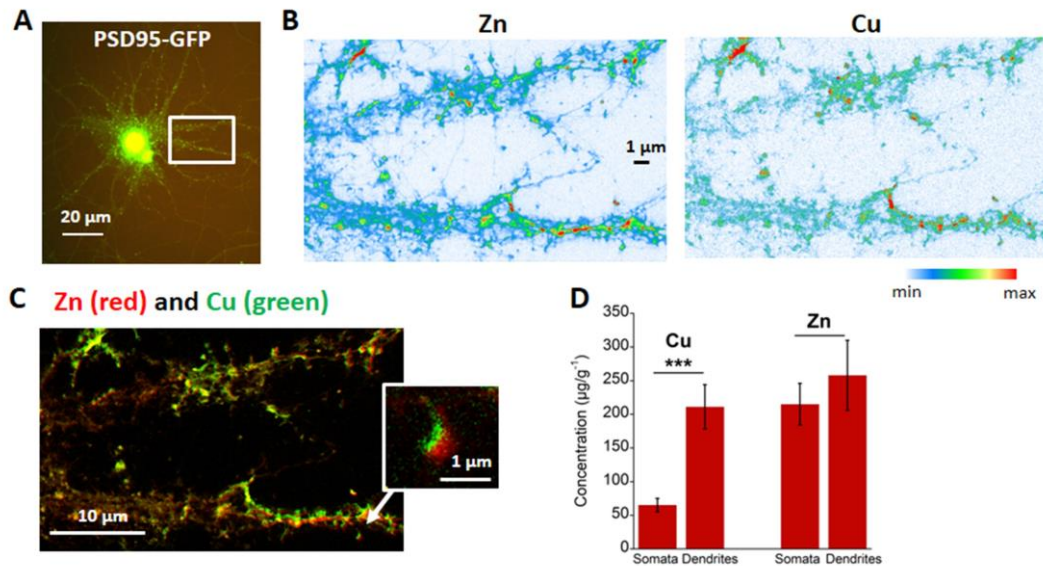


Figure 7B.32. Distributions de Zn et de Cu dans les dendrites. (A) Microscopie à épifluorescence d'un neurone d'hippocampe de rat en culture primaire (DIV21) marqué avec PSD-95-GFP (marqueur des compartiments post-synaptiques). (B) Images par nano-SXRF de Zn et Cu dans la zone dendritique encadrée en (A). (C) Image de la superposition de Zn et Cu, montrant une colocalisation partielle dans les dendrites, et une distribution séparée dans les épines isolées, comme illustré dans la région zoomée. (D) Comparaison des concentrations de Cu et de Zn ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de masse sèche) dans les corps et les dendrites neuronales (moyenne \pm s.e.m.), mesurées par micro-PIXE. (***) $p < 0,001$. Images obtenues sur la ligne ID16-NI de l'ESRF (Perrin 2017).

Après avoir élucidé cette compartimentation, nous nous sommes intéressés à la possible interaction entre le Zn, le Cu et des protéines de stabilisation du cytosquelette, comme l'actine et la tubuline. Nous avons effectué une microscopie d'immunofluorescence quantitative pour mesurer l'expression de la β -tubuline et la F-actine dans les neurones hippocampiques de rats qui ont été traités au Zn (ZnCl_2 , 10 μM , 24 heures), et dans des cellules de contrôle. La supplémentation en Zn a entraîné une augmentation de 34 % de l'intensité moyenne de la fluorescence de la β -tubuline par rapport aux témoins et une augmentation de 8 % de l'intensité moyenne de la fluorescence de la F-actine (figure 7B.33). De même, nous avons fait de la microscopie d'immunofluorescence quantitative sur des neurones supplémentés avec des concentrations subcytotoxiques de Cu (CuSO_4 , 5 μM , 24 heures). Nous avons mesuré que la supplémentation en Cu a entraîné une diminution de 15 % de l'intensité moyenne de la fluorescence de la β -tubuline par rapport aux témoins et une diminution de 13 % de l'intensité moyenne de la fluorescence de la F-actine (figure 7B.34). Afin de mieux comprendre ces résultats, le nombre de zones riches en F-actine, appelées *actine hot spots*, a été compté. Le nombre de ces *actine hot spots* est réduit de 9 % à la suite de l'exposition au Cu par rapport aux témoins. Ces résultats montrent une relation entre ces protéines et ces métaux.

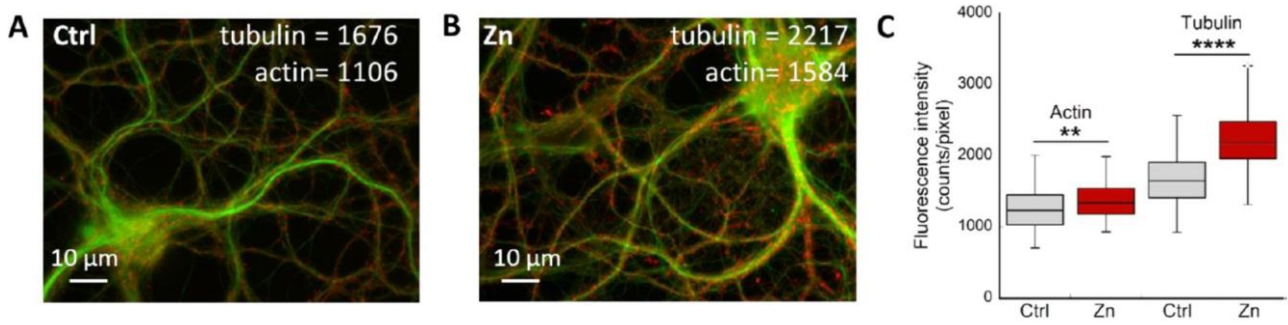


Figure 7B.33. Teneur en F-Actine et β -Tubuline dans les neurones témoins et les neurones traités au Zn. (A) Images représentatives au microscope à fluorescence de la F-actine (rouge) et de la β -tubuline (verte) dans les dendrites des neurones témoins et (B) neurones traités au Zn (10 μ M, 24 heures). (C) Comparaison des intensités de fluorescence de la F-actine et de la β -tubuline (moyenne \pm s.e.m) pour l'ensemble des groupes (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; test U de Mann-Whitney) (Perrin 2017).

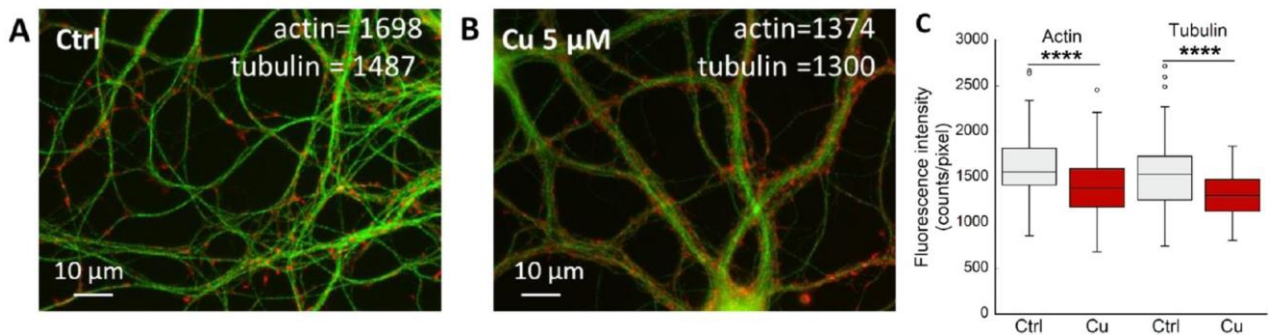


Figure 7B.34. Teneur en F-Actine et β -Tubuline dans les neurones témoins et les neurones traités au Cu. (A) Images représentatives au microscope à fluorescence de la F-actine (rouge) et de la β -tubuline (verte) dans les dendrites des neurones témoins et (B) neurones traités au Cu (5 μ M, 24 heures). (C) Comparaison des intensités de fluorescence de la F-actine et de la β -tubuline (moyenne \pm s.e.m) pour l'ensemble des groupes (**** $p < 0,0001$; test U de Mann-Whitney) (Perrin 2017).

c. Imagerie corrélative à super-résolution des métaux et des protéines du cytosquelette neuronal

Nous avons conçu un protocole spécifique consistant en une microscopie STED sur des cellules vivantes sur des supports de nitrure de silicium (Si_3N_4), suivies d'un traitement cryogénique des cellules avant l'imagerie par nano-SXRF. Dans la partie B section 6, j'ai présenté un *workflow* résumant cette méthodologie. Les neurones primaires de l'hippocampe du rat ont été cultivés *in vitro* pendant 15 jours (DIV15) sur des membranes Si_3N_4 stériles placées au-dessus d'une couche nourricière d'astrocytes. Les membranes sont biocompatibles, exemptes de métaux traces, d'épaisseur de 500 nm, transparentes, plates, rigides et développées pour la microscopie à rayons X. Pour effectuer la microscopie STED, nous avons coloré les neurones vivants avec des fluorochromes de type SiR, avec la SiR-tubulin et la SiR700-actin. Ce sont des

fluorophores spécifiquement développés pour la microscopie STED. Les images STED ont été enregistrées avec une résolution spatiale de 40 nm. Ensuite, les membranes ont été congelées par immersion dans du 2-méthylbutane refroidi à $-165\text{ }^{\circ}\text{C}$ et lyophilisées à $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous vide secondaire avant d'être analysées. Finalement les échantillons ont été analysés par nano-SXRF et imagerie à contraste de phase (PCI) par rayonnement synchrotron avec un faisceau de rayons X de 40 nm à une énergie de 17 KeV sur la ligne de lumière ID16A à l'ESRF.

Le cuivre est principalement situé à la base des protrusions où il est colocalisé avec le signal de fluorescence le plus élevé de l'actine-F (figure 7B.35). Même si le cuivre est concentré dans les régions les plus riches en actine-F des épines dendritiques, sa distribution n'est que partiellement localisée avec celle de l'actine-F. Le cuivre pourrait peut-être servir de cofacteur aux protéines de remodelage de l'actine comme la cofiline, comme suggéré par des études de métallogénomique (Smith 2004). Le résultat le plus frappant de cette approche de microscopie corrélative est l'observation de la colocalisation du zinc et de la tubuline dans les processus dendritiques minces, comme l'illustre la figure 7B.36. Cette figure montre des filaments de microtubules parallèles observés par microscopie STED (vert), ces filaments de tubuline parallèles n'ont pas pu être résolus par microscopie confocale, mais uniquement par microscopie STED. La microscopie nano-SXRF effectuée sur la même zone a permis de séparer les distributions d'éléments des deux processus dendritiques minces (figure 7B.36 d-e). Le tracé du profil des intensités des signaux relatifs du zinc et de la tubuline à travers les deux filaments de tubuline montre la colocalisation de leurs distributions. Le zinc suivait la même distribution que les microtubules selon une stœchiométrie de 1:1, suggérant un rôle direct dans le processus dendritique du zinc sur la tubuline en accord avec le modèle de Löwe et les travaux de Eagle, Hesketh et Craddock (Eagle 1983 ; Hesketh 1983 ; Craddock 2012). De même, le zinc est fortement corrélé avec la densité de matière comme le montrent les images de contraste de phase, figure 7B.35 e-i, ce qui suggère que, dans le processus synaptique, le zinc pourrait être localisé dans la PSD, ce qui serait en accord avec les résultats montrant l'expression de ZnT1 dans la PSD (Sindreu 2014).

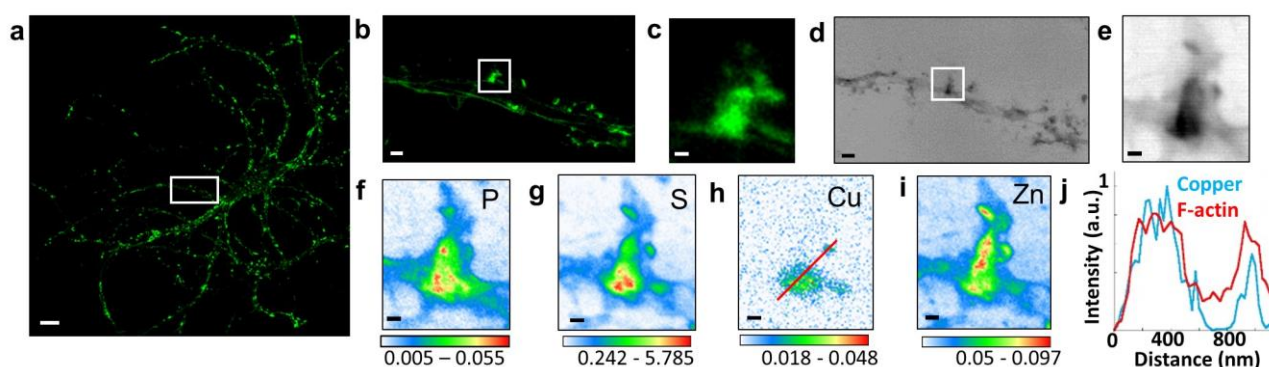


Figure 7B.35. Microscopie STED corrélative de la SiR-actine avec PCI et XRF synchrotron dans les épines. (a) Imagerie confocale d'un neurone primaire de l'hippocampe chez le rat marqué avec la SiR-actine montrant des protubérances riches en F-actine le long des dendrites. (b) Imagerie STED de la SiR-actine, de la zone entourée en a. (c) Zoom de la région b. (d) PCI par rayonnement synchrotron de la région dendritique encadrée en a. (e) Zoom sur la région encadrée en (d). (f-i) Cartes des éléments SXRF (P, S, Cu, Zn) de la région d'intérêt encadrée en (b) et (d). (j) Intensité de l'actine-F (rouge) et du cuivre (bleu) le long de la ligne rouge tracée en (h). Barres d'échelle : 200 nm, sauf pour (a) 10 mm, (b) et (d) 1 mm. L'imagerie synchrotron a été réalisée sur la ligne ID16A de l'ESRF (Domart 2020).

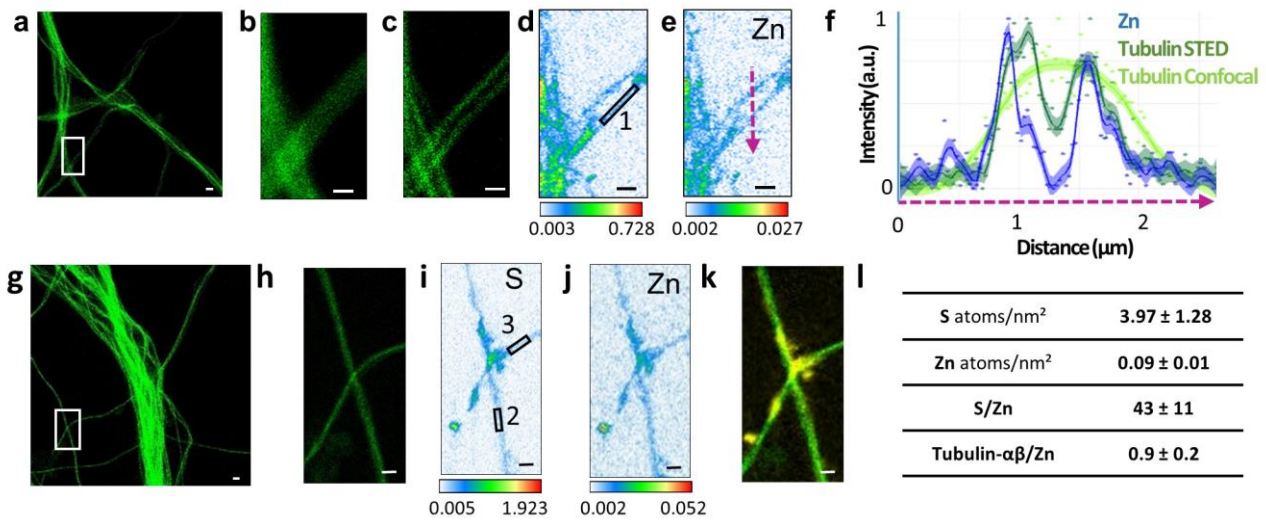


Figure 7B.36. Imagerie STED et nano-SXRF corrélative dans les dendrites. (a, g) Images STED de SiR-tubuline dans les dendrites. (b) Image confocale de SiR-tubuline de la région encadrée en (a). (c, h) STED SiR-tubuline image de la région encadrée en (a, g). (d, i) Cartes SXRF du soufre. (e, j) Cartes SXRF du zinc. (f) Profils de la courbe d'intensité du zinc, STED SiR-tubuline, et confocale SiR-tubuline le long d'une ligne de balayage traversant deux dendrites fines (ligne pointillée magenta en (e)). (k) Image superposée de STED SiR-tubuline (vert) et distribution du zinc (jaune). (l) Analyse des données quantitatives sur le soufre et le zinc exprimées en atom·nm⁻² pour 21 régions d'intérêt centrées sur les microtubules minces comme illustré pour les roi 1 à 3 encadrés en (d) et (i) (moyenne ± SD). Barres d'échelle : 500 nm, sauf pour (a) et (g) 1 mm. L'imagerie synchrotron a été réalisée sur la ligne ID16A de l'ESRF (Domart 2020).

Toujours en relation avec l'étude de la liaison entre Cu, Zn et actine, tubuline, nous avons déterminé par SXRF la distribution des éléments chimiques qui composent les cônes de croissance et comparé cette localisation avec les distributions de la tubuline et la F-actine obtenues par la technique STED. Le cône de croissance neuronale est un site majeur de la dynamique de la surface membranaire, et il est associé à l'absorption et à la libération de matériaux, à la motilité et à l'extension des axones. De plus, ces structures montrent une compartimentation de la distribution d'actine et de la tubuline. En utilisant notre approche corrélative, nous avons imagé la compartimentation de l'actine et de la tubuline dans les cônes de croissance des neurones vivants (DIV3) et à l'aide des sondes SiR-F-actine et SiR-tubuline en utilisant la microscopie STED. Les deux protéines ont montré une compartimentation très marquée, figure 7B.37, la tubuline (vert) le long des dendrites et la F-actine (magenta) davantage dans la tête du cône de croissance.

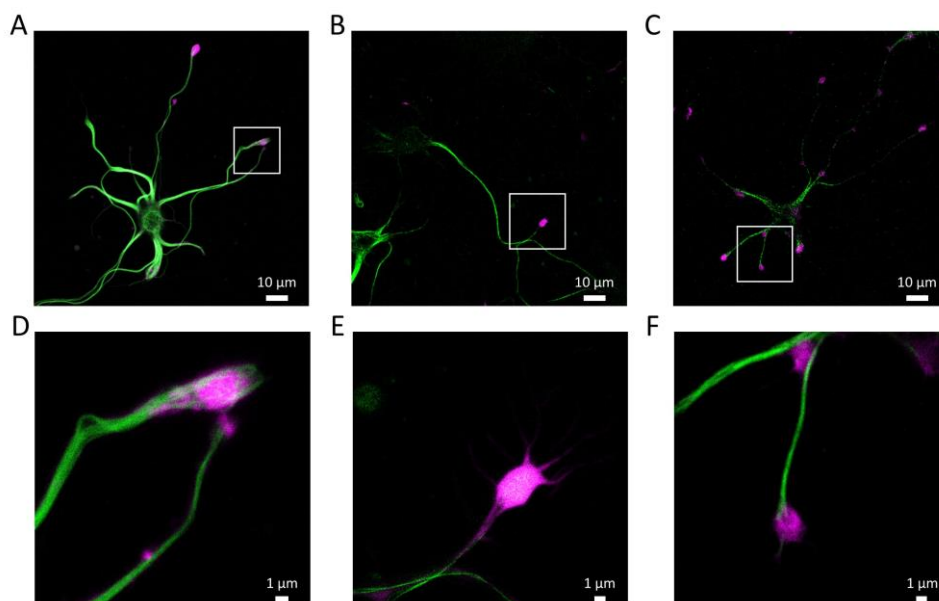


Figure 7B.37. Distribution de la tubuline (vert) et de la F-actine (magenta) dans les cônes de croissance des neurones de l'hippocampe. Images confocales (A), (B) et (C) dans les neurones vivants. (D), (E) et (F) images STED sur les cônes de croissance dans la région correspondante marquée en (A), (B) et (C) (Carmona 2022).

Une fois les neurones imagés par STED, les échantillons ont été cryofixés et maintenus dans les vapeurs d'azote. Les analyses par nano-SXRF ont été réalisées sur la ligne 9-ID-B à l'APS avec une résolution spatiale de 95 nm et un flux de 10^9 photons·s⁻¹. Les analyses menées en congelé-hydraté n'ont pas été un succès, à cause de la faible intensité du signal de détection. Probablement parce que la cryofixation, réalisée avec le méthylbutane, facilite la formation d'une couche de glace dans les échantillons, qui fait que les rayons X émis par l'échantillon sont atténués dans cette couche et la détection n'est pas performante. C'est pourquoi dorénavant nous allons mettre en œuvre la cryofixation avec du propane, que je développerai dans la partie C. Néanmoins, nous avons pu analyser les cônes de croissance sur des échantillons lyophilisés. Malheureusement, le cuivre n'a pas pu être détecté sûrement à cause de la faible intensité du faisceau de photons incidents qui fait que cet élément est en dessous de la limite de détection. Le flux de photons est 100 fois moindre que sur ID16A à l'ESRF (seule ligne où nous avons pu détecter le cuivre).

Cependant, les cônes de croissance contiennent S, Cl, K, Ca, Fe et Zn, ce qui indique que ces éléments sont essentiels au développement et à la mobilité des neurones (figure 7B.38). Ces éléments montrent un enrichissement à la tête des cônes de croissance, soit parce qu'il y a un enrichissement en protéines dans cette partie du cône, soit parce qu'ils sont spécifiquement nécessaires aux protéines impliquées dans la motilité. Une autre constatation est que le fer est présent sous forme de taches (figures 7B.38 et 7B.39), probablement dans des vacuoles, et qu'il n'est pas colocalisé avec un autre élément. Le Ca présente parfois une distribution granulaire (figure 7B.39), probablement aussi séquestrée dans des vacuoles, prêt à être transportée par les canaux du Ca²⁺. Enfin, dans les dendrites emmenant jusqu'au cône de croissance, on observe la compartimentation du Cl, du K et du Ca, ce qui indique qu'ils sont séquestrés ou transportés par des protéines différentes (figure 7B.40).

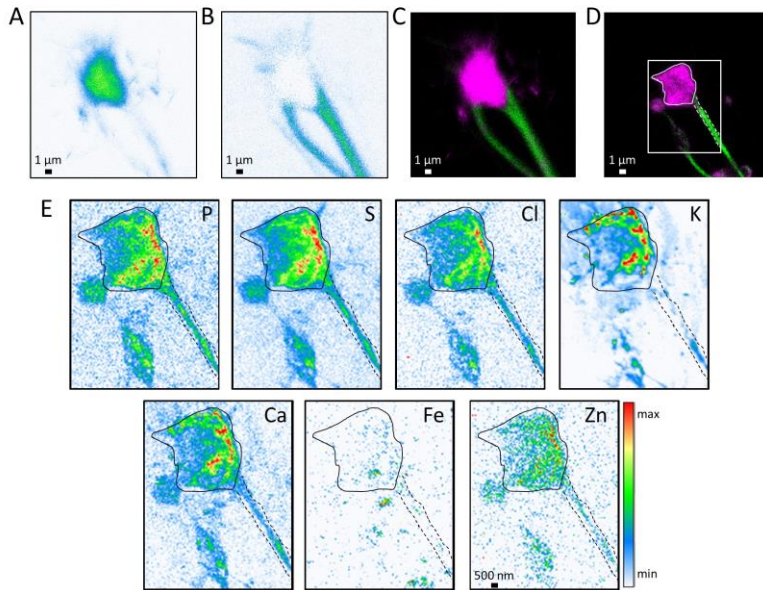


Figure 7B.38. Distribution STED de la F-actine (A) et la tubuline (B), et images superposées (C) dans un cône de croissance sur cellule vivante. (D) Images confocales de l'actine et la tubuline dans le même cône après cryofixation et lyophilisation. (E) Images obtenues par nano-SXRF sur la ligne 9-ID-B de l'APS des éléments chimiques qui composent les cônes de croissance (Carmona 2022).

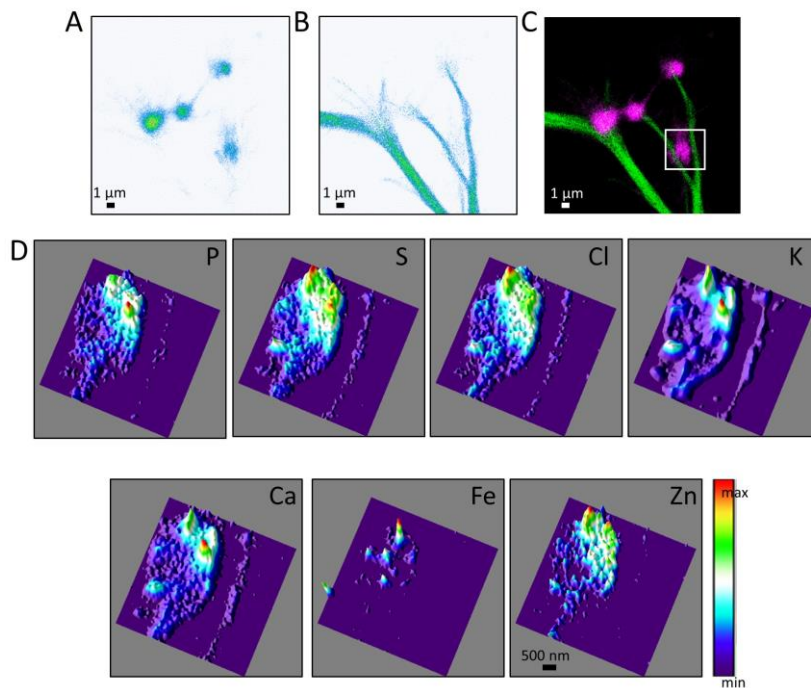


Figure 7B.39. Distribution STED de la F-actine (A) et la tubuline (B), et images superposées (C) dans un cône de croissance sur cellule vivante. (D) Images obtenues par nano-SXRF sur la ligne 9-ID-B de l'APS des éléments chimiques qui composent les cônes de croissance (Carmona 2022).

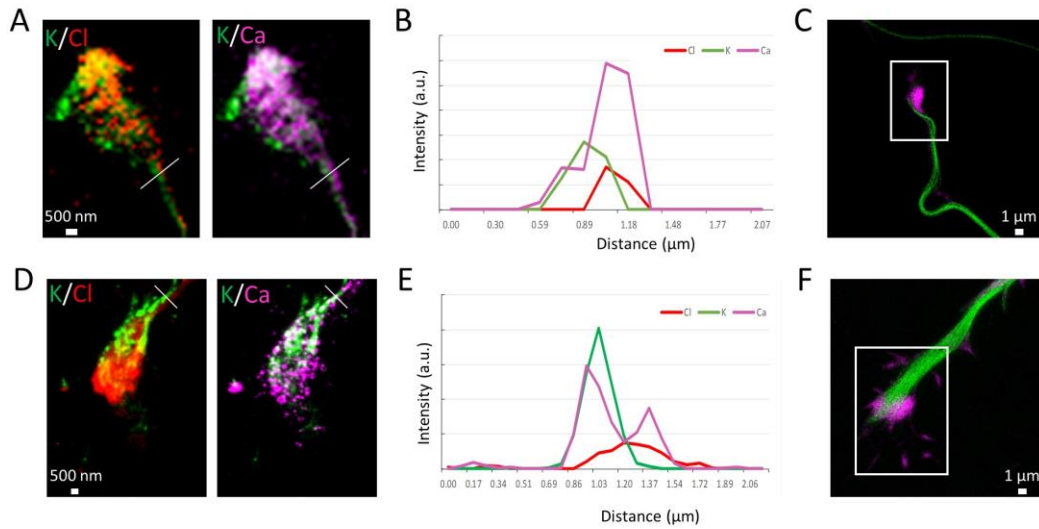


Figure 7B.40. Profil de distribution élémentaire dans les cônes de croissance. (A), (D) images SXRF fusionnées de K (vert) et Cl (rouge) ou Ca (magenta) dans deux cônes de croissance après cryofixation et lyophilisation. (B), (E) profils de l'intensité des rayons X pour chaque élément, dans la ligne plate correspondante (A) et (D). (C), (F) Images de la tubuline (vert) et de la F-actine (magenta) en microscopie STED, les mêmes cônes de croissance qu'en (A) et (D) mais sur cellule vivante (Carmona 2022).

Partie C. Projet de recherche et conclusions

1. Projet de recherche : imagerie cryo-corrélative

L'équilibre des métaux biologiques (en particulier le Mn, le Fe, le Cu et le Zn) est fortement altéré dans la plupart, voire la totalité, des maladies neurodégénératives (Acevedo 2019). Nombreux sont les troubles neurodégénératifs qui présentent une pathologie possiblement associée aux métaux à travers certaines métalloprotéines ou enzymes spécifiques (Jellinger 2013). Mes activités de recherche visent à mettre en évidence une colocalisation directe métal-protéine qui indiquerait des interactions spécifiques et contribuerait à élucider des mécanismes pathologiques.

L'approche corrélative développée dans la partie B section 6.1 s'avère suffisamment bonne pour identifier des grands organites, comme l'appareil de Golgi (Carmona 2019 a). Mais cette approche présente aussi des limitations quand les structures à corrélérer sont petites. Par exemple, nous avons vu dans le cas de l'uranium que toutes les vésicules du chemin endo-lysosomal sont proches les unes des autres et présentent une petite taille, quelques centaines de nanomètres. Nous avons montré une tendance, mais pas une corrélation parfaite, entre l'une des organelles marquées et l'uranium (Carmona 2021). Le principal frein à la corrélation vient de la phase de lyophilisation. Pendant la lyophilisation, les cellules perdent l'eau par sublimation, elles se dessèchent et donc rétrécissent. De ce fait, la taille et la position des structures cellulaires sont légèrement modifiées si nous comparons avant/après lyophilisation. Un autre facteur limitant dans l'approche corrélative est le temps qui s'écoule entre l'observation par fluorescence sur cellule vivante et la cryofixation. En général nous accomplissons l'imagerie sur cellule vivante en moins d'une heure et l'échantillon est cryofixé juste après l'observation. Malgré le délai court, nous avons vu, en étudiant les cônes de croissance, que ces structures sont très dynamiques et leur position pouvait changer légèrement durant ce laps de temps. Les marqueurs SiR-tubuline et SiR-actine que nous avons utilisés bloquent aussi la motilité des neurones, donc l'imagerie avant/après était faisable, en revanche j'ai aussi utilisé des marqueurs GFP-actine sur des cellules vivantes, et les cônes de croissance bougeaient le temps de réaliser deux images consécutives.

À l'échelle nanométrique, la localisation des protéines sur cellule vivante et la corrélation avec les images des métaux après le processus de préparation d'échantillons n'est pas souhaitable, et donc mon projet sera de développer une autre méthodologie corrélative plus généralisée. Ainsi l'idéal serait de faire la colocalisation sur des échantillons où nous savons qu'il n'y a pas de modifications ni de taille, ni de position. Comme déjà vu dans la partie B section 4, la microscopie photonique ne peut pas être effectuée sur des échantillons lyophilisés, car les fluorochromes sont altérés par ce processus. Nous avons vu que les sondes type GFP perdent leurs propriétés d'émission et que l'intensité de fluorescence des sondes type SiR est très faible après lyophilisation. En outre, par microscopie SXRF, si nous voulons imager le contenu métallique dans des petites structures cellulaires, il est nécessaire d'avoir un flux de photons très focalisé et intense. Cet intense flux de photons peut endommager les échantillons lors des analyses à température ambiante, en revanche, si les échantillons sont préservés dans un environnement cryogénique, la structure est préservée pendant l'analyse.

Toutes ces raisons nous amènent à combiner la microscopie photonique et SXRF en conditions cryogéniques. Si nous voulons nous affranchir de tous ces problèmes, nous sommes obligés de travailler en conditions cryogéniques à la fois pour l'observation des protéines et pour l'imagerie de métaux. Donc **mon objectif dans les prochaines années est de développer une microscopie corrélative en mode cryogénique. Les cellules seront d'abord cryofixées et après la microscopie photonique et l'imagerie par SXRF seront accomplies en maintenant tout au long du processus les cellules dans un état congelé-hydraté.** Le workflow de travail est présenté dans la figure C.1.

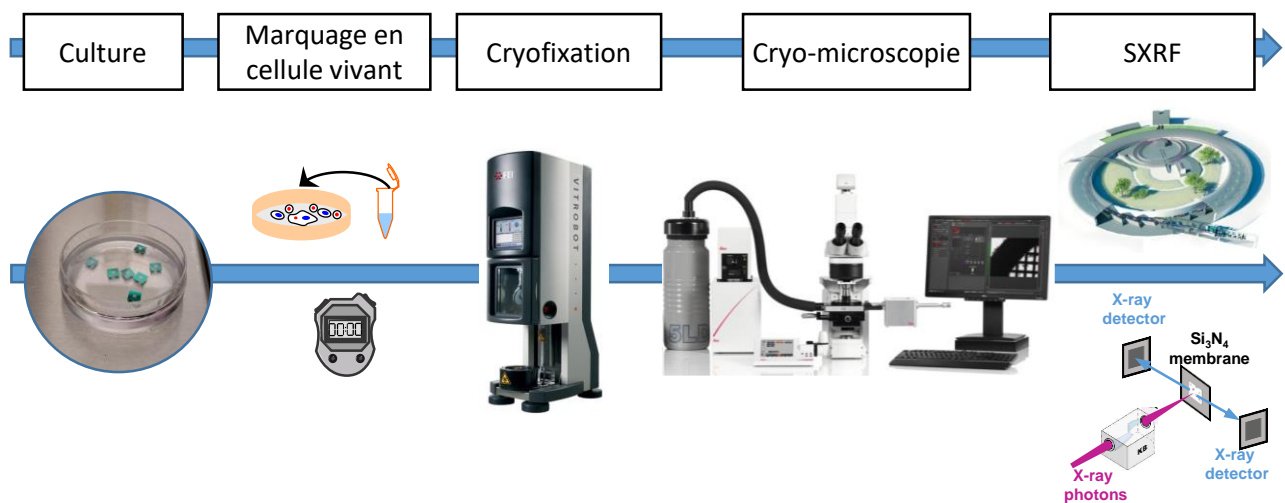


Figure C.1. Workflow pour la corrélation en conditions cryogéniques de la microscopie à fluorescence et de la fluorescence de rayons X par synchrotron.

Pour atteindre cet objectif, j'ai instauré trois étapes successives : la première est d'améliorer la cryofixation, la deuxième est de corréler en conditions cryogéniques l'épifluorescence et l'imagerie synchrotron, et la troisième de faire de l'imagerie corrélative en conditions de super-résolution. Ensuite, je vais développer chacune de ces étapes et illustrerai quelques exemples d'applications à haute résolution spatiale.

1.1 Cryofixation

Nous avons déjà vu qu'avant l'analyse, les cellules doivent être vitrifiées par congélation en plongée rapide pour maintenir les ions métalliques près de leur état natif, maintenir la nano-morphologie des cellules et protéger davantage l'échantillon contre les dommages causés par les radiations. Jusqu'à présent (partie B section 5) nous avons réalisé la cryofixation par immersion rapide de l'échantillon dans un liquide cryoprotecteur refroidi au préalable à la température de l'azote liquide. Le liquide que nous utilisons est le 2-méthylbutane mais l'utilisation d'éthane est encouragée puisque ce composé présente des propriétés plus adaptées à la cryofixation. Il est plus volatil et évite la formation de glace à la surface de l'échantillon.

Par exemple, nous avons utilisé le 2-méthylbutane pour la congélation des cellules HeLa exprimant la protéine SLC30A10. À l'ESRF, sur la ligne ID16A, nous avons réussi à imager la distribution des éléments chimiques dans les cellules, mais pendant la manipulation, nous avons eu quelques difficultés. Nous avons constaté, avant de réaliser le transfert de l'échantillon à la chambre d'analyse, que certaines cibles étaient recouvertes d'une fine couche de glace. Nous avons transféré dans la chambre d'analyse seulement des cibles qui ne semblaient pas avoir de couche de glace, mais, à certains endroits, la détection des rayons X était très faible, voire quasiment nulle. Grâce au système d'acquisition, nous avons pu estimer la mesure de la couche de glace et constater qu'elle n'était pas homogène et, qu'effectivement, à certains endroits, la glace était si épaisse qu'elle empêchait la détection des rayons X. Une expérience similaire a été faite à l'APS, où l'analyse des neurones en congelé-hydraté n'a pas été possible. Cette fois-là, deux facteurs ont sûrement joué un rôle, le flux de photons et l'épaisseur de glace. Comme le flux de photons est environ 100 fois moins important qu'à l'ESRF, l'émission des rayons X par la cible et sa détection sont aussi plus faibles. Ce fait, ajouté à l'atténuation suivie par les rayons X émis quand ils traversent la couche de glace, nous a conduits à ne pas pouvoir réaliser d'images de ce type d'échantillons.

Nous réaliserons la cryofixation à l'aide d'une technologie de cryofixation de pointe en utilisant un congélateur en plongée automatisée (FEI Vitrobot) et qui utilise de l'éthane comme liquide cryogénique. Cet appareil disponible depuis peu au BIC (Bordeaux Imaging Center) contrôle l'humidité dans la chambre où est déposé l'échantillon avant l'immersion, il contrôle aussi la force et le temps de *blotting* des restes du liquide de rinçage, ainsi que la vitesse d'immersion de la cible dans l'éthane. D'autres équipes ont obtenu des résultats encourageants pour ce type de préparation dans des échantillons biologiques ; donc je suis confiante. Un autre point auquel il faut faire attention et qui fait partie du processus de cryofixation est le stockage. Il faut trouver un moyen de conserver les échantillons de manière à éviter l'humidité et leur contamination par contact avec de solutions non ultra-pures. Je pense notamment au cas où les cibles sont stockées en immersion dans l'azote ou par contact avec les vapeurs d'azote. Pour déterminer quels paramètres et conditions sont les plus appropriés, il faudra préparer des échantillons en changeant les conditions et vérifier la morphologie et la propreté des cibles.

1.2 Cryocorrélative : épifluorescence-SXRF

Cette partie va être menée en collaboration avec le Bordeaux Imaging Center (BIC). Le BIC fait partie des infrastructures de base nationales (France BioImaging) et européennes (EuroBioImaging) et offre des ressources en microscopie photonique et électronique telles que la microscopie confocale, la microscopie STED, PALM, dSTORM, Light Sheet microscopy et CLEM. Le BIC développe et met en œuvre de nouveaux systèmes d'imagerie afin d'améliorer la résolution/détection en profondeur/vitesse d'acquisition. C'est cette infrastructure que j'ai utilisée pour la réalisation de la technique STED sur les membranes de nitrure de silicium et où je suis accueillie pendant les travaux d'infrastructure de mon laboratoire d'affectation. Aussi, récemment, le BIC électronique a implémenté la technique Cryo-CLEM, cryocorrélation par microscopies optique et électronique (de l'anglais *Cryo Correlative Light and Electron Microscopy*).

Pour l'observation des protéines fluorescentes nous utiliserons un cryomicroscope commercial récemment acquis au BIC pour la microscopie par cryofluorescence à résolution intermédiaire (système Leica EM-cryoCLEM). Ce microscope a été adapté avec des lasers d'excitation assez puissants pour pouvoir faire de la microscopie confocale ou d'épifluorescence sur des cellules cryofixées sans faire de coupes. La résolution

latérale de ce système est de l'ordre des 300 nm et compatible avec l'analyse de nombreux organites cellulaires. Pour l'analyse des métaux dans des conditions cryogéniques à une résolution d'environ 300 nm, plusieurs lignes de faisceaux synchrotron peuvent être utilisées à l'ESRF, l'APS ou DESY.

Nous l'avons testé, et certains points sont à dénouer. Le premier est d'avoir un support adapté à nos cibles pour le transfert et l'observation. Les échantillons, après cryofixation, sont conservés dans les vapeurs d'azote et doivent être maintenus à basse température à tout moment. Le système de transfert doit permettre de manipuler l'échantillon et de le déposer dans un support adapté à l'observation. Ce support sera introduit dans le cryomicroscope à l'aide d'un bras articulé, et il faut veiller à ce que le système soit toujours refroidi. Aujourd'hui, nous sommes en contact avec la compagnie Leica qui a développé un système de transfert et de stabilisation de nos supports de nitrure de silicium. Mais il doit être amélioré puisque, pour le moment, l'humidité se dépose sur nos échantillons déjà avant le transfert et aussi pendant les analyses en fluorescence. Ce problème peut venir du design de la boîte de transfert (il n'y a pas assez d'espace pour maintenir la température de l'échantillon basse avec les vapeurs d'azote) ou parce que nous avons utilisé le méthylbutane pour la cryofixation et que la petite couche de glace qui se forme attire l'humidité sur elle. Nous devons donc faire des tests sur ce point une fois la cryofixation avec l'éthane réalisée.

Un autre point qu'il faut travailler pour mener la microscopie corrélative en conditions cryogéniques est d'établir des positions de repère. En CLEM, des microsphères fluorescentes sont ajoutées aux échantillons avant la cryofixation. Ces billes en plastique se collent sur le support et servent de points de repère grâce à l'émission de fluorescence dans une large gamme du spectre. L'utilisation de ces billes nous permettrait de positionner les deux images obtenues par les deux techniques. À cause de l'étape de rinçage avant la cryofixation, l'ajout de ces billes n'est pas une tâche aisée, et la meilleure option est probablement d'ajouter ces billes pendant la culture. D'autres points sont à vérifier : si les microsphères sont stériles et ultra-pures, si elles donnent des signaux en SXRF ou avec une autre technique, comme le contraste de phase qui peut être utilisé simultanément avec la fluorescence des rayons X.

Avec la microscopie cryocorrélative en mode épifluorescence nous obtenons l'avantage de l'immobilisation des structures cellulaires pendant l'observation en fluorescence et le maintien de cette immobilisation pour *a posteriori* la microscopie par SXRF. Ainsi, nous pourrions corrélérer des petites structures mobiles, comme les vésicules que nous avons identifiées dans l'étude de la localisation du manganèse dans les cellules exprimant la protéine SLC30A10 ou les vésicules contenant de l'uranium insoluble. Les images en épifluorescence, de même que par SXRF, seront en deux dimensions avec une information sur tout le volume de la cellule ou du neurone sondé. Cette microscopie présente des limitations en matière de résolution spatiale, par exemple il ne sera pas possible de différencier des structures à l'intérieur d'une synapse ou de séparer deux points distants de moins de 200 nm. Ainsi pour rompre les limites de résolution dues à la diffraction de la lumière, je souhaite aussi développer la microscopie cryocorrélative en utilisant la technique cryo-PALM qui nous permettra d'atteindre des résolutions spatiales de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres, comme dans les lignes synchrotron les plus puissantes.

1.3 Cryocorrélative : cryo-PALM et cryo-nano-SXRF

L'adaptation du système STED pour faire de la microscopie en conditions cryogéniques n'est pas envisageable à cause de la complexité du système, des excitations/déplétions par différents lasers, des plusieurs objectifs interchangeables, la stabilité du système... Donc pour pouvoir développer un flux de travail entièrement cryogénique et en super-résolution, j'ai choisi d'implémenter la technique cryo-PALM pour la microscopie des protéines, puisque la faisabilité de la technique PALM en conditions cryogéniques a déjà été démontrée (Sartori 2007).

La technique PALM est fondée sur l'utilisation de deux lasers, un laser UV et un laser de lecture. Le laser UV active les fluorophores de manière stochastique. En choisissant une faible puissance UV, seule une petite fraction des molécules est activée, permettant d'isoler des molécules individuelles. Le laser de lecture permet ensuite de visualiser les fluorophores qui ont été activés. Les centroïdes de chacune des molécules fluorescentes sont alors calculés et considérés comme un pixel de l'image finale super-résolue. Le processus est répété des milliers de fois, et l'image est reconstruite par addition des centroïdes (Betzig 2006). La microscopie PALM utilise des protéines fluorescentes variantes de la GFP (*Green Fluorescent Protein*) (MacDonald 2015). Les cellules sont transfectées de manière à exprimer le gène codant pour la protéine d'intérêt (ou une protéine ligand) liée à la protéine fluorescente. La microscopie PALM présente la caractéristique d'être compatible avec l'imagerie sur cellules vivantes et avec l'imagerie en conditions cryogéniques avec les fluorophores appropriés. Le cryo-PALM offre de nombreuses applications biologiques pour identifier les organites (mitochondries, lysosomes, endosomes...), les structures des sous-organites, les compartiments subsynaptiques, et toute protéine d'intérêt à haute résolution spatiale (25 nm). De plus, la technique cryo-PALM sera compatible avec d'autres techniques que la SXRF, telles que la XAS par synchrotron (spectroscopie d'absorption des rayons X) pour déterminer la spéciation chimique des éléments d'intérêt.

Ce projet de développement sera mené en collaboration avec Monica Fernandez Monreal, du Bordeaux Imaging Center (BIC). Comme dit précédemment, le BIC est équipé d'un système commercial de microscopie par cryofluorescence (Leica EM-CryoCLEM, Linkam Cryo-stage) qui sera adapté pour effectuer la microscopie de localisation par cryo-photo-activation (Cryo-PALM) (Dahlberg 2020). Cette modalité de localisation de molécule unique est fondée sur l'expression de protéines fluorescentes photo-activables/commutables, dans l'activation stochastique de molécules uniques, et dans leur localisation par un logiciel dédié. Le BIC a déjà obtenu des résultats préliminaires passionnants montrant que les protéines photoconvertibles peuvent être activées dans des conditions cryogéniques (figure C.2) et il espère augmenter la résolution à 20 à 50 nm.

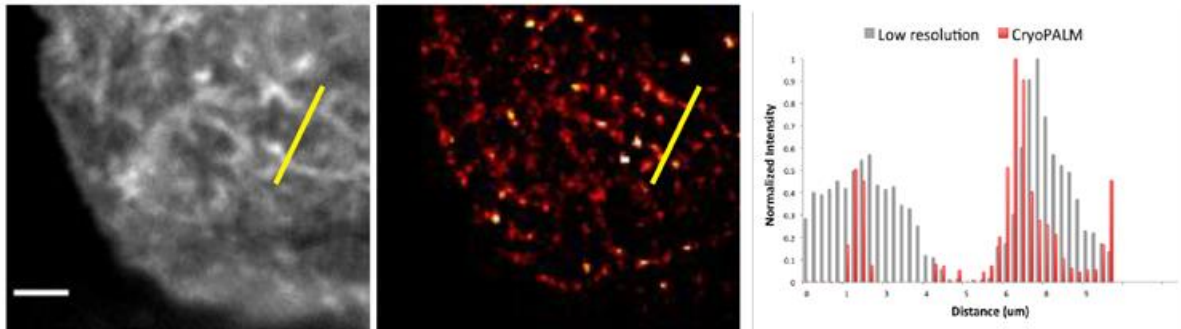


Figure C.2. Images cryo-PALM d'une cellule COS-7 transfectée avec l'alpha-actinine marquée avec la protéine photosensible mEos2.0. Le panneau de gauche montre une image par diffraction et le panneau du milieu une image super-résolue par reconstruction des traceurs cryo-PALM. Le graphique de gauche montre le profil d'intensité des deux images. Barres d'échelle de 5 μm .

Cependant, cette approche doit être optimisée avec l'acquisition d'une caméra EMCCD (*Electron Multiplying Charge-Couple Device*) pour augmenter la sensibilité lors de l'acquisition. Nous devons également adapter nos systèmes actuels à l'acquisition PALM avec un nouveau jeu de filtres pour deux faisceaux à excitation simultanée et pour collecter des bandes d'émission de longueurs d'onde spécifiques. Enfin, nous passerons au crible et caractériserons la photophysique des protéines photo-convertibles disponibles. En plus, l'Institut interdisciplinaire des neurosciences (IINS) (avec lequel nous collaborons depuis 2015) de l'Université de Bordeaux pourra nous fournir des constructions de protéines fluorescentes photo-convertibles (Nemet 2015) par le biais de son service de biologie cellulaire. Finalement, ce système nous permettra de réduire la résolution à 25 nm. Bien sûr, cette méthodologie corrélative pourra s'appliquer à de nombreuses études sur l'interaction métal-protéine. Nous pourrions être capables de marquer n'importe quelle protéine et déterminer si elle colocalise et/ou modifie la distribution de certains éléments chimiques.

1.4 Applications

Pour valider cette méthodologie corrélative, je compte l'appliquer tout d'abord à notre projet ANR sur la toxicologie synaptique de métaux lourds et à plus long terme à l'étude de la distribution du manganèse.

Projet de recherche sur la neurotoxicologie synaptique des métaux environnementaux

L'exposition environnementale aux métaux neurotoxiques est un problème de santé mondial. Quatre métaux (As, Cd, Hg et Pb) ont été répertoriés parmi les dix substances chimiques les plus préoccupantes pour la santé publique (WHO 2010). Ils ont tous des effets neurotoxiques (voir les profils toxicologiques de l'ATSDR, 2022). Le Mn et l'U sont deux autres éléments de plus en plus préoccupants (Dinocourt 2015 ; Miah 2020). L'impact exact de l'exposition environnementale aux métaux sur les fonctions neuronales est difficile à évaluer, mais on soupçonne qu'il affecte largement la population humaine. Les sources d'exposition environnementale humaine sont diverses, qu'il s'agisse de l'air, de l'alimentation ou de l'eau potable. Il existe de nombreux exemples d'expositions environnementales localisées, ou plus répandues, à des métaux toxiques dans le monde (Charron 2012) (Frisbie 2002).

Selon la période d'exposition au cours de la vie, ces métaux affectent le neurodéveloppement, le neurocomportement, la cognition et sont impliqués dans l'étiologie des maladies neurodégénératives (pour des revues : Weiss 2011 ; Charlet 2012 ; Modabbernia 2017 ; Ijomone 2020 ; Chandravanshi 2021). Par exemple, dans le cas de la MA, la forme la plus courante de démence qui touche plus de 50 millions de personnes dans le monde et qui devrait presque doubler tous les 20 ans selon l'OMS. Malgré des décennies de recherche, les causes de la maladie d'Alzheimer restent insaisissables. Une solution pour faire face à ce problème global est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la neurotoxicité des métaux et de concevoir des stratégies de prévention ciblées.

Notre hypothèse est que les métaux neurotoxiques pourraient se lier directement aux protéines du cytosquelette (actine, tubuline...) dans les neurones, ce qui entraînerait une désorganisation structurelle des synapses, conduisant à des altérations de la connectivité synaptique et finalement à la perte des synapses.

Il existe de plus en plus de preuves d'une toxicité spécifique de l'As, du Cd, du Hg, du Mn, du Pb et de l'U envers le cytosquelette neuronal. L'arsenic supprime la croissance des neurites, un mécanisme induit par la diminution, entre autres, des niveaux de tubuline (Aung 2013). De même, il réduit la différenciation neuronale et l'expression de la protéine β -tubuline (Stern 2014). Sur des systèmes non neuronaux, fibroblaste pulmonaire en culture, l'arsenic induit un désassemblage dose-dépendant des microtubules en ciblant la tubuline (Zhao 2012). Le cadmium induit le désassemblage du cytosquelette dans une variété de cellules neuronales en culture, en ciblant à la fois les réseaux d'actine (Ge 2019) et des microtubules (Gerspacher 2009) (Wang 2016). Sur des systèmes non neuronaux, cellules pulmonaires en culture, le cadmium provoque une oxydation significative des protéines régulant le cytosquelette d'actine (Go 2013). In vitro et dans des fibroblastes en culture, le plomb inhibe l'assemblage des microtubules et dépolymérise les microtubules de tubuline (Zimmermann 1988). Dans les cellules de neuroblastome, le mercure induit une perturbation des microtubules à des concentrations nettement plus faibles que dans les fibroblastes, ce qui indique une sensibilité particulière des cellules nerveuses au mercure (Stoiber 2004). L'exposition au mercure entraîne une réduction de l'expression de la tubuline dans différents types cellulaires (Choi 2011) (Stern 2014) (Li 2018). Dans les muscles des poissons, la β -actine est la principale protéine de liaison au Hg (Nong 2021). Des concentrations de manganèse pertinentes pour l'environnement altèrent la morphologie et la structure du cytosquelette dans les cellules souches neuronales adultes en diminuant la polymérisation de la F-actine (Parsons-White 2018). Récemment nous avons identifié les protéines du cytosquelette d'actine comme l'une des quatre principales voies canoniques ciblées par la toxicité de l'uranium (Vidaud 2020). Dans les cellules rénales humaines, l'expression des gènes et des protéines codant pour l'actine et la tubuline était régulée à la baisse lors de l'exposition à l'uranium (Prat 2005). Dans un modèle de poisson zèbre visant à étudier la toxicité environnementale de l'uranium, l'actine a été identifiée comme une protéine de liaison potentielle de l'uranium (Eb-Levadoux 2017).

L'actine et la tubuline sont les protéines du cytosquelette les plus largement exprimées et sont impliquées dans la formation, la plasticité et la stabilité des synapses (Bucher 2020 ; Parato 2021). L'actine est le principal élément du cytosquelette des épines dendritiques. La polymérisation ou dépolymérisation dynamique des filaments d'actine (F-actine) sert de force motrice pour la formation ou la rétraction des épines dendritiques. Les microtubules sont formés par la polymérisation d'hétérodimères $\alpha\beta$ -tubuline et sont localisés principalement dans les axones et les dendrites mais aussi dans les synapses (Parato 2021). La désorganisation de la structure cytosquelettique synaptique est impliquée dans de nombreux

dysfonctionnements neurologiques, notamment les troubles neurodéveloppementaux (ex. : autisme) (Joensuu 2018 ; Lasser 2018), et les maladies neurodégénératives (ex. : MA) (Dent 2017 ; Pelucchi 2020).

En résumé, au niveau cellulaire, il existe de nombreuses preuves des effets toxiques des métaux sur le cytosquelette neuronal. Une information manquante importante que nous aimerions fournir est de montrer que les synapses sont les premières cibles des dommages du cytosquelette neuronal. Cela serait déterminant pour comprendre les effets neurotoxiques précoces puisque la perte de connectivité synaptique devrait précéder des altérations plus radicales telles que la neurodégénération. En comparant six métaux neurotoxiques, avec une réactivité (bio)chimique différente, notre objectif est de montrer que l'altération du cytosquelette synaptique induite par les métaux est un mécanisme d'action général.

En utilisant la nano-imagerie synchrotron XRF, nous avons déjà détecté la présence de niveaux endogènes de Pb le long des excroissances de neurites dans des cellules PC12 différenciées de type neurone (Carmona 2008 a). Pour cette expérience, aucun Pb n'a été ajouté au milieu de culture. Ce résultat prouve la faisabilité de l'imagerie du Pb à très faible concentration (endogène) dans les cellules, donc après exposition à des concentrations environnementales. Ce résultat indique également la probable colocalisation du Pb avec les microtubules. Ainsi, avec le cryo-PALM, notre objectif sera de déterminer la distribution de l'actine et de la tubuline à l'intérieur des synapses et dans les dendrites, et de corrélérer leur distribution avec celle des métaux toxiques. Grâce à la plateforme de biologie moléculaire de l'IINS, nous pourrions synthétiser d'autres protéines photo-activables qui jouent un rôle dans la stabilité de l'actine et de la tubuline. Notre objectif ultime sera de montrer la colocalisation des métaux toxiques avec une protéine unique à l'intérieur d'une synapse d'un neurone.

Projet de recherche biomédicale sur la distribution du Mn dans des modèles cellulaires du parkinsonisme

A plus long term je tiens à approfondir sur le rôle du manganèse dans les formes de parkinsonisme familial. Dans un premier temps avec une résolution spatiale intermédiaire, je déterminerai la localisation du manganèse pour quatre mutants SLC30A10 qui provoquent le parkinsonisme familial (L89P, Δ 98-134, T196P, Q308Stop) et à haute résolution spatiale, je déterminerai si le manganèse est piégé dans le réseau cis ou trans Golgien ou s'il circule vers des compartiments en aval, comme les lysosomes, pour mieux comprendre ses mécanismes de toxicité. J'utiliserai, via le service de biologie cellulaire de l'IINS, différentes constructions des protéines d'intérêt (galactosyltransférase 1 pour le réseau trans-Golgi, GM130 pour le réseau cis-Golgi et LAMP1 pour les lysosomes) marquées avec des protéines fluorescentes photo-convertibles (Nemet 2015).

2. Conclusions

Dans mon bilan de recherche, nous pouvons apprécier le gain en résolution spatiale qu'a connu, ces dernières années, la technique de spectroscopie de fluorescence des rayons X. À chaque nouveau progrès s'ouvrent de nouvelles possibilités et de nouveaux champs de recherche. Ce qui nous a permis d'analyser des tissus, des cellules, l'intérieur des cellules, les synapses et même l'intérieur de ces synapses. Mais également à chaque échelle microscopique traversée s'ouvrent à nous de nouvelles difficultés ou défis pour identifier les cellules, les organelles, les protéines ou les molécules qui interagissent avec les métaux que nous étudions. Nous avons intégré à nos recherches la microscopie photonique, d'abord avec la mise en œuvre de l'épifluorescence et ensuite en rendant compatible la technique STED. Nous avons cherché des fluorochromes adaptés à la préparation d'échantillons et nous avons imaginé différentes façons de corrélérer les images métal-protéine obtenues par différentes techniques, que ce soit dans la même cellule, dans le tissu adjacent ou dans des systèmes biologiques équivalents.

Toutes ces évolutions et l'état de l'art actuel m'ont amenée à ce qui sera mon projet de recherche : développer l'imagerie corrélative en conditions cryogéniques et en rendant compatibles les techniques spectroscopiques XRF par synchrotron et PALM. Les deux techniques seront appliquées sur le même échantillon, la même cellule et la même zone, sans aucune modification de l'état physique, et les deux techniques seront conduites sur des échantillons congelés-hydratés.

J'espère que ce manuscrit reflète la grande implication au niveau expérimental que je me suis donné pendant mes travaux. Mon implication et les recherches que j'ai entreprises ont été très empiriques et concernaient tant la culture des cellules et des neurones, la recherche de fluorochromes, l'amélioration des protocoles de préparation des échantillons et la réalisation de l'imagerie synchrotron. Pendant ces années j'ai travaillé avec nombreuses personnes qui ont séjourné dans l'équipe, doctorants, stagiaires, masters et postdoctorants, et avec d'autres que j'ai côtoyés pendant les expériences synchrotron. Certaines personnes ont été aussi sous ma tutelle et cette expérience a éveillé en moi l'envie de m'impliquer davantage dans le processus d'encadrement. Je souhaite partager mes projets, transmettre l'envie de la recherche et éveiller l'intérêt pour découvrir le rôle des métaux dans le cerveau. J'ai envie de le faire avec de jeunes chercheurs et de voir avancer mes projets en partageant des discussions scientifiques, des manipulations et des rêves. C'est donc pour ces motifs qu'aujourd'hui je me suis décidé à présenter mon HDR pour m'investir dans la formation par la recherche et l'encadrement.

Partie D. Références

- Acevedo K, Masaldan S., Opazo C.M., Bush A.I. Redox active metals in neurodegenerative diseases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 24, 2019, pages 1141-1157. <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01731-9>.
- Adams F., Janssens K., Snigirev A. Microscopic X-ray fluorescence analysis and related methods with laboratory and synchrotron radiation sources. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13, issue 5, 1998, pages 319-331. <https://doi.org/10.1039/A707100K>
- Aitken P.G., Borgdorff A.J., Juta A.J., Kiehart D.P., Somjen G.G., Wadman W.J. Volume changes induced by osmotic stress in freshly isolated rat hippocampal neurons. *Pflugers Archiv*, 436, issue 6, 1998, pages 991-998. <https://doi.org/10.1007/s004240050734>
- Al-Ebraheem A., Dao E., Desouza E., Li C., Wainman B.C., McNeill F.E., Farquharson M.J. Effect of sample preparation techniques on the concentrations and distributions of elements in biological tissues using μ SRXRF: a comparative study. *Physiological Measurement*, 36, issue 3, 2015, pages N51-60. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/36/3/N51>.
- Alturkistani H.A., Tashkandi F.M., Mohammedsaleh Z.M. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global Journal of Health Science*, 8, issue 3, 2016, pages 72-79. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n3p72>.
- Aschner M. The transport of manganese across the blood–brain barrier. *NeuroToxicology*, 27, issue 3, 2006, pages 311-314. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2005.09.002>.
- Aschner M., Erikson K.M., Herrero Hernández E., Tjalkens R. Manganese and its role in Parkinson's disease: from transport to neuropathology. *Neuromolecular Medicine*, 11, issue 4, 2009, pages 252-266. <https://doi.org/10.1007/s12017-009-8083-0>.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), ATSDR Toxicological Profiles, <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiledocs/index.html>
- Aung K.H., Kurihara R., Nakashima S., Maekawa F., Nohara K., Kobayashi T., Tsukahara S. Inhibition of neurite outgrowth and alteration of cytoskeletal gene expression by sodium arsenite. *Neurotoxicology*, 34, 2013, 226-235. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.09.008>
- Barber D.S., Hancock S.K., McNally A.M., Hinckley J., Binder E., Zimmerman K., Ehrich, M.F., Jortner B.S. Neurological effects of acute uranium exposure with and without stress. *NeuroToxicology*, 28, issue 6, 2007, pages 1110–1119. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.05.014>.
- Barberet Ph., Incerti S., Andersson F., Delalee F., Serani L., Moretto Ph. Technical description of the CENBG nanobeam line. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 267, Issues 12–13, 2009, pages 2003-2007. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2009.03.077>.

Barr C.A., Burdette S.C. The zinc paradigm for metalloneurochemistry. *Essays in Biochemistry*, 61, 2017, pages 225-235. <https://doi.org/10.1042/EBC20160073>.

Bensoussan H., Grancolas L., Dhieux-Lestaevél B., Delissen O., Vacher C.M., Dublineau I., Voisin P., Gourmelon P., Taouis M., Lestaevél P. Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure. *Toxicology*, 261, issues 1-2, 2009, pages 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.04.054>.

Bertsch P.M., Hunter D.B. Applications of synchrotron-based X-ray microprobes. *Chemical Reviews*, 101, issue 6, 2001, pages 1809-1842. <https://doi.org/10.1021/cr990070s>.

Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., Hess H.F. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 313, Issue 5793, 2006, pages 1642-1645. <https://doi.org/10.1126/science.1127344>

Boesenberg U., Ryan C. G., Kirkham R., Siddons D. P., Alfeld M., Garrevoet J., Núñez T., Claussen T., Kracht T., Falkenberg G. Fast X-ray microfluorescence imaging with submicrometer-resolution integrating a Maia detector at beamline P06 at PETRA III. *Journal of Synchrotron Radiation*, 23, issue 6, 2016, pages 1550–1560. <https://doi.org/10.1107/S1600577516015289>.

Boonrunsiman S., Gentleman E., Carzaniga R., Evans N.D., McComb D.W., Porter A. E., Stevens M.M.,. The role of intracellular calcium phosphate in osteoblastmediated bone apatite formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, issue 35, 2012, pages 14170-14175. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208916109>.

Bornhorst J., Wehe Ch., Hu`wel S., Karst U., Galla H. J., Schwerdtle T. Impact of Manganese on and Transfer across Blood-Brain and Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 287, issue 21, 2012, pages 17140-17151. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.344093>.

Bresson C., Darolles C., Carmona A., Gautier C., Sage N., Roudeau S., Ortega R., Ansoborlo E., Malard V. Cobalt chloride speciation, mechanisms of cytotoxicity on human pulmonary cells, and synergistic toxicity with zinc. *Metallomics*, 5, issue 2, 2013, pages 133-143. <https://doi.org/10.1039/c3mt20196a>

Briner W. Effects of depleted uranium on mouse midbrain catecholamines and related behavior. *The Internet Journal of Toxicology*, 7, issue 1, 2008, pages 1-7.

Bucher M., Fanutza T., Mikhaylova M. Cytoskeletal makeup of the synapse: Shaft versus spine. *Cytoskeleton*, 77, issue 3-4, 2020, pages 55-64. <https://doi.org/10.1002/cm.21583>.

Bussy C., Lestaevél P., Dhieux B., Amourette C., Paquet F., Gourmelon P., Houpert P. Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *NeuroToxicology*, 27, issue 2, 2006, pages 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2005.11.003>.

Campbell J.L., Boyd N.I., Grassi N., Bonnick P., Maxwell J.A. The Guelph PIXE software package IV. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 268, Issue 20, 2010, pages 3356-3363. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2010.07.012>.

Carmona A., Deves G., Ortega R. Quantitative micro-analysis of metal ions in subcellular compartments of cultured dopaminergic cells by combination of three ion beam techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, issue 6, 2008 a, pages 1585-1594. <http://doi.org/10.1007/s00216-008-1866-6>.

Carmona A., Cloetens P., Devès G., Bohic S., Ortega R. Nano-imaging of trace metals by synchrotron X-ray fluorescence into dopaminergic single cells and neurite-like processes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23, issue 8, 2008 b, pages 1083-1088. <https://doi.org/10.1039/B802242A>.

Carmona A., Devès G., Roudeau S., Cloetens P., Bohic S., Ortega R. Manganese accumulates within Golgi apparatus in dopaminergic cells as revealed by synchrotron X-Ray fluorescence nano-imaging. *ACS Chemical Neurosciences*, 1, issue 3, 2010, pages 194-203. <https://doi.org/10.1021/cn900021z>.

Carmona A., Roudeau S., Perrin L., Veronesi G., Ortega R. Environmental manganese compounds accumulate as Mn(II) within the Golgi apparatus of dopamine cells: relationship between speciation, subcellular distribution, and cytotoxicity. *Metallomics*, 6, issue 4, 2014, pages 822-832. <http://doi.org/10.1039/c4mt00012a>

Carmona A., Roudeau S., L'Homel B., Pouzoulet F., Bonnet-Boissinot S., Prezado Y., Ortega R. Heterogeneous intratumoral distribution of gadolinium nanoparticles within U87 human glioblastoma xenografts unveiled by micro-PIXE imaging. *Analytical Biochemistry*, 523, 2017, pages 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.02.010>.

Carmona A., Malard V., Avazeri E., Roudeau S., Porcaro F., Paredes E., Vidaud C., Bresson C., Ortega R. Uranium exposure of human dopaminergic cells results in low cytotoxicity, accumulation within sub-cytoplasmic regions, and down regulation of MAO-B. *NeuroToxicology*, 68, 2018, pages 177-188. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.07.019>.

Carmona A., Zogzas C.E., Roudeau S., Porcaro F., Garrevoet J., Spiers K.M., Salomé M., Cloetens P., Mukhopadhyay S., Ortega R. SLC30A10 Mutation Involved in Parkinsonism Results in Manganese Accumulation within Nanovesicles of the Golgi Apparatus. *ACS Chemical Neuroscience*, 10, issue 1, 2019 a, pages 599–609. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00451>

Carmona A., Roudeau S., Perrin L., Carcenac C., Vantelon D., Savasta M., Ortega R. Mapping Chemical Elements and Iron Oxidation States in the Substantia Nigra of 6-Hydroxydopamine Lesioned Rats Using Correlative Immunohistochemistry With Proton and Synchrotron Micro-Analysis. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 2019 b, page 1014. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01014>

Carmona A., Porcaro F., Somogyi A., Roudeau S., Domart F., Medjoubi K., Aubert M., Isnard H., Nonell A., Rincel A., Paredes E., Vidaud C., Malard V., Bresson C., Ortega R. Cytoplasmic aggregation of uranium in human dopaminergic cells after continuous exposure to soluble uranyl at non-cytotoxic concentrations. *NeuroToxicology*, 82, 2021, pages 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.10.015>.

Carmona A., Chen S., Domart F., Choquet D., Ortega R. (2022) Imaging the structural organization of chemical elements in growth cones of developing hippocampal neurons. *Metallomics*, 14(1), mfab073. <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfab073>.

Carter S.D., Hampton C.M., Langlois R., Melero R., Farino Z.J., Calderon M.J., Li W., Wallace C.T., Tran N.H., Grassucci R.A., Siegmund S.E., Pemberton J., Morgenstern T.J., Eisenman L., Aguilar J.I., Greenberg N.L., Levy E.S., Yi E., Mitchell W.G., Rice W.J., Wigge Ch., Pilli J., George E.W., Aslanoglou D., Courel M., Freyberg R.J., Javitch J.A., Wills Z.P., Area-Gomez E., Shiva S., Bartolini F., Volchuk A., Murray S.A., Aridor M., Fish K.N., Walter P., Balla T., Fass D., Wolf S.G., Watkins S.C., Carazo J.M., Jensen G. J., Frank J., Freyberg Z. Ribosome-associated vesicles: A dynamic subcompartment of the endoplasmic reticulum in secretory cells. *Science Advances*, 6, issue 14, 2020, eaay9572. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay9572>

Chandravanshi L., Shiv K., Kumar S. Developmental toxicity of cadmium in infants and children: a review. *Environmental Analysis Health and Toxicology*, 36, issue 1, 2021, pages e2021003-0. <https://doi.org/10.5620/eaht.2021003>.

Chang C.J. Searching for harmony in transition-metal signaling. *Nature Chemical Biology* 11,2015, pages 744-747. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1913>.

Charlet L., Chapron Y., Faller P., Kirsch R., Stone A.T., Baveye P.C. Neurodegenerative diseases and exposure to the environmental metals Mn, Pb, and Hg. *Coordination Chemistry Reviews*, 256, issues 19-20, 2012, pages 2147-2163. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.012>.

Charron D.F. In: *Ecohealth Research in Practice*. Editors: Charron D.F., International Development Research Centre, Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0517-7>

Chen P., Bowman A. B., Mukhopadhyay S., Aschner M. SLC30A10: a novel manganese transporter. *Worm*, 4, 2015, page e1042648. <https://doi.org/10.1080/21624054.2015.1042648>.

Chen S., Paunesku T., Yuan Y., Deng J., Jin Q., Hong Y. P., Vine D. J., Lai B., Flachenecker C., Hornberger B., Brister K., Jacobsen C., Woloschak G. E., Vogt S. 2D/3D cryo x-ray fluorescence imaging at the bionanoprobe at the advanced photon source. *AIP Conference Proceedings*, 1696, 2016, 020028. <https://doi.org/10.1063/1.4937522>

Choi W.S., Kim S.J., Kim J.S. Inorganic lead (Pb)- and mercury (Hg)-induced neuronal cell death involves cytoskeletal reorganization. *Laboratory Animal Research*, 27, issue 3, 2011, pages 219-225. <https://doi.org/10.5625/lar.2011.27.3.219>

Chu W.K., Mayer J.W., Nicolet M.A. *Backscattering spectrometry*. Academic Press, Orlando, Florida, 1978, 1st edition, ISBN: 9780323152051.

Chwiej J., Szczerbowska-Boruchowska M., Lankosz M., Wojcik S., Falkenberg G., Stegowski Z., Setkowicz Z.. Preparation of tissue samples for x-ray fluorescence microscopy. *Spectrochimica Acta Part B*, 60, issue 12, 2005, 1531–1537. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2005.10.002>

Coling D., Kachar B. Theory and application of fluorescence microscopy. *Current Protocols in Neuroscience*, 1997, Chapter 2, Unit 2.1. John Wiley & Sons, Inc.

Colvin R.A., Jin Q., Lai B., and Kiedrowski L. Visualizing Metal Content and Intracellular Distribution in Primary Hippocampal Neurons with Synchrotron X-Ray Fluorescence. *PLoS One*, 11, issue 7, 2016, pages e0159582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159582>

Craddock T.J., Tuszynski J.A., Chopra D., Casey N., Goldstein L.E., Hameroff S.R., Tanzi R.E. The zinc dyshomeostasis hypothesis of Alzheimer's disease. *PLOS ONE*, 7, 2012, page e33552.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033552>

da Silva J. C., Pacureanu A., Yang Y., Bohic S., Morawe C., Barrett R., Cloetens P. Efficient concentration of high energy x-rays for diffraction-limited imaging resolution. *Optica* 4, issue 5, 2017, pages 492–495.

<https://doi.org/10.1364/OPTICA.4.000492>.

Dahlberg P.D., Saurabh S., Sartor A.M., Wang J., Mitchell P.G., Chiu W., Shapiro L., Moerner W.E. Cryogenic single-molecule fluorescence annotations for electron tomography reveal in situ organization of key proteins in *Caulobacter*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117, issue 25, 2020, pages 13937-13944. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001849117>.

D'Ambrosi N, Rossi L. Copper at synapse: release, binding and modulation of neurotransmission.

Neurochemistry International, 90, 2015, pages 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.07.006>.

Das S., Carmona A., Khatua K., Porcaro F., Somogyi A., Ortega R. Datta A. Manganese Mapping Using a Fluorescent Mn²⁺ Sensor and Nanosynchrotron X-ray Fluorescence Reveals the Role of the Golgi Apparatus as a Manganese Storage Site. *Inorganic Chemistry*, American Chemical Society, 58 (20), 13724–13732, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01389>.

Davies K. M., Bohic S., Carmona A., Ortega R., Cottam V., Hare D. J., Finberg J.P., Reyes S., Halliday G.M., Mercer J.F., Double K.L. Copper pathology in vulnerable brain regions in Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 35, issue 4, 2014, pages 858-66. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.034>.

Dent E.W. Of microtubules and memory: implications for microtubule dynamics in dendrites and spines.

Molecular Biology of the Cell, 28, issue 1, 2017, pages 1-8. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-11-0769>.

Dexter D.T., Statton S.A., Whitmore C., Freinbichler W., Weinberger P., Tipton K.F., Corte L.D., Ward R.J., Crichton R.R. Clinically available iron chelators induce neuroprotection in the 6-OHDA model of Parkinson's disease after peripheral administration. *Journal of Neural Transmission*, 118, issue 2, 2011, pages 223-231. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0531-3>.

Dinocourt C., Legrand M., Dublineau I., Lestaevél, P. The neurotoxicology of uranium. *Toxicology*, 337, 2015, pages 58-57. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.08.004>.

Domart F. Nano-imagerie corrélative de fluorescence X synchrotron et de super résolution des métaux et des protéines dans les synapses de neurones d'hippocampe. thèse de doctorat. Université de Bordeaux, 2019. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02363022>.

Domart F., Cloetens P., Roudeau S., Carmona A., Verdier E., Choquet D., Ortega R. Correlating STED and synchrotron XRF nano-imaging unveils cosegregation of metals and cytoskeleton proteins in dendrites. *Elife*, 9, 2020, e62334. <https://doi.org/10.7554/eLife.62334>.

Drayer B., Burger P., Darwin R., Riederer S., Herfkens R., Johnson G. A. MRI of brain iron. *AJR American Journal of Roentgenology*, 147, issue 1, 1986, pages 103-110. <https://doi.org/10.2214/ajr.147.1.103>.

Dučić T., Barski E., Salome M., Koch J.C., Bähr M., Lingor P. X-ray fluorescence analysis of iron and manganese distribution in primary dopaminergic neurons. *Journal of Neurochemistry*, 124, issue 2, 2013, pages 250-261. <https://doi.org/10.1111/jnc.12073>.

- Dučić T., Carboni E., Lai B., Chen S., Michalke B., Lázaro D.F., Outeiro T.F., Bähr M., Barski E., Lingor P. Alpha-Synuclein Regulates Neuronal Levels of Manganese and Calcium. *ACS Chem Neurosci*, 6, issue 10, 2015, pages 1769-1779. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00093>.
- Eagle G.R., Zombola R.R., Himes R.H. Tubulin-zinc interactions: binding and polymerization studies. *Biochemistry*, 22, issue 1, 1983, pages 221-228. <https://doi.org/10.1021/bi00270a032>
- Eb-Levadoux Y, Frelon S., Simon O., Arnaudguilhem C., Lobinski R., Mounicou S. In vivo identification of potential uranium protein targets in zebrafish ovaries after chronic waterborne exposure. *Metallomics*, 9, issue 5, 2017, pages 525-534. <http://dx.doi.org/10.1039/C6MT00291A>.
- Elder H.Y. Cryofixation. In: *Techniques in Immunocytochemistry*. Editors: Bullock G.R., Petrusz P., Academic Press, Elsevier, London, 1989, Volume 4, pages 1-28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-140407-9.50005-2>.
- Friedman A., Galazka-Friedman J. The history of the research of iron in parkinsonian substantia nigra. *Journal of Neural Transmission*, 119, 2012, pages 1507-1510. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0894-8>.
- Frisbie S.H., Ortega R., Maynard D.M., Sarkar B. The concentrations of arsenic and other toxic elements in Bangladesh's drinking water. *Environmental Health Perspectives*, 110, issue 11, 2002, pages 1147-53. <https://doi.org/10.1289/ehp.021101147>.
- Ge Y., Song X., Chen L., Hu D., Hua L., Cui Y., Liu J., An Z., Yin Z., Ning H. Cadmium induces actin cytoskeleton alterations and dysfunction in Neuro-2a cells. *Environmental Toxicology*, 34, issue 4, 2019, pages 469-475. <https://doi.org/10.1002/tox.22700>
- Gerspacher C., Scheuber U., Schiera G., Proia P., Gygax D., Di Liegro I. The effect of cadmium on brain cells in culture. *International Journal of Molecular Medicine*, 24, issue 3, 2009, pages 311-318. <https://doi.org/10.3892/ijmm.00000234>.
- Go Y.M., Orr M., Jones D.P. Actin cytoskeleton redox proteome oxidation by cadmium. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 305, issue 11, 2013, pages L831-43. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00203.2013>.
- Guan X., Xu X., Zhang M. Region-Specific Iron Measured by MRI as a Biomarker for Parkinson's Disease. *Neuroscience Bulletin*, 33, 2017, pages 561-567. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0138-x>.
- Hackett M.J., McQuillan J.A., El-Assaad F., Aitken J. B., Levina A., Cohen D.D., Siegele R., Carter E.A., Grau G.E., Hunt N.H., Lay P.A. Chemical alterations to murine brain tissue induced by formalin fixation: implications for biospectroscopic imaging and mapping studies of disease pathogenesis, *Analyst*, 136, 2011, pages 2941-2952. <https://doi.org/10.1039/c0an00269k>.
- Hare D.J., George J.L., Grimm R., Wilkins S., Adlard P.A., Cherny R.A., Bush A.I., Finkelstein D.I., Doble P. Quantitative elemental bio-imaging of Mn, Fe, Cu and Zn in 6-hydroxydopamine induced Parkinsonism mouse models. *Metallomics* 1, 2009, pages 53-58. <https://doi.org/10.1039/b816188g>.
- Hare D.J., George J.L., Grimm R., Wilkins S., Adlard P.A., Cherny R.A., Bush A.I., Finkelstein D.I., Doble P. Three-dimensional elemental bio-imaging of Fe, Zn, Cu, Mn and P in a 6-hydroxydopamine lesioned mouse brain. *Metallomics* 2, 2010, pages 745-753. <https://doi.org/10.1039/c0omt00039f>.

- Hatori Y., Yan Y., Schmidt K., Furukawa E., Hasan N.M., Yang N., Liu C.N., Sockanathan S., Lutsenko S. Neuronal differentiation is associated with a redox-regulated increase of copper flow to the secretor pathway. *Nature Communications*, 7, 2016, page 1064. <https://doi.org/10.1038/ncomms10640>.
- He Y., Thong P.S., Lee T., Leong S.K., Shi C.Y., Wong P.T., Yuan S.Y., Watt F. Increased iron in the substantia nigra of 6-OHDA induced parkinsonian rats: a nuclear microscopy study. *Brain Research*, 735, 1996, pages 149-153. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00313-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00313-7).
- He Q., Song N., Xu H., Wang R., Xie J., Jiang H. Alpha-synuclein aggregation is involved in the toxicity induced by ferric iron to SK-N-SH neuroblastoma cells. *Journal of Neural Transmission*, 118, issue 3, 2011, pages 397-406. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0453-0>.
- Hell S.W., Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 19, issue 11, 1994, pages 780-782. <https://doi.org/10.1364/OL.19.000780>
- Hell S.W., Dyba M., Jakobs S. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy. *Current Opinion in Neurobiology*, 14, issue 5, 2004, pages 599-609. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.08.015>.
- Henriksson J., Tjälve H., Manganese Taken Up into the CNS via the Olfactory Pathway in Rats Affects Astrocytes. *Toxicological Sciences*, 55, issue 2, 2000, pages 392–398. <https://doi.org/10.1093/toxsci/55.2.392>.
- Hesketh J.E. Zinc binding to tubulin. *International Journal of Biochemistry*, 15, 1983, pages 743-746. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(83\)90202-1](https://doi.org/10.1016/0020-711X(83)90202-1).
- Hignette O., Cloetens P., Rostaing G., Bernard P., Morawe C. Efficient sub 100nm focusing of hard x rays. *Review of Scientific Instruments*, 76, 2005, page 063709. <https://doi.org/10.1063/1.1928191>
- Hignette O., Cloetens P., Morawe C., Borel C., Ludwig W., Bernard P., Rommeveaux A. Bohic S. Nanofocusing at ESRF using graded multilayer mirrors. *AIP Conference Proceedings*, 879, issue 1, 2007, pages 792-795.
- Hillmer A.S., Putcha P., Levin J., Högen T., Hyman B.T., Kretzschmar H., McLean P.J., Giese A. Converse modulation of toxic alpha-synuclein oligomers in living cells by N'-benzylidenebenzohydrazide derivatives and ferric iron. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391, issue 1, 2010, pages 461-466. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.080>.
- Hutchens S., Liu C., Jursa T., Shawlot W., Chaffee B.K., Yin W., Gore A.C., Aschner M., Smith D.R., Mukhopadhyay S. Deficiency in the manganese efflux transporter SLC30A10 induces severe hypothyroidism in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 292, issue 23, 2017, pages 9760-9773. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.783605>.
- Ijomone O.M., Ifenatuoha C.W., Aluko O.M., Ijomone O.K., Aschner M. The aging brain: impact of heavy metal neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 50, issue 9, 2020, pages 801-814. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1838441>.
- James S.A., Myers D.E., de Jonge M.D., Vogt S., Ryan C.G., Sexton B.A., Hoobin P., Paterson D., Howard D.L., Mayo S.C., Altissimo M., Moorhead G.F., Wilkins S.W. Quantitative comparison of preparation methodologies for X-ray fluorescence microscopy of brain tissue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 2011, pages 853-864. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4978-3>

- Jellinger KA. The relevance of metals in the pathophysiology of neurodegeneration, pathological considerations. *International Review of Neurobiology*, 110, 2013, pages 1-47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410502-7.00002-8>.
- Jin Q., Paunesku T., Lai B., Gleber S.C., Chen S.I., Finney L., Vine D., Vogt S., Woloschak G., Jacobsen C. Preserving elemental content in adherent mammalian cells for analysis by synchrotron-based x-ray fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 265, issue 1, 2017, pages 81-93. <https://doi.org/10.1111/jmi.12466>.
- Jinsmaa Y., Sullivan P., Gross D., Cooney A., Sharabi Y., Goldstein D.S. Divalent metal ions enhance DOPAL-induced oligomerization of alpha-synuclein. *Neuroscience Letters*, 569, 2014, pages 27-32. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.03.016>.
- Joensuu M., Lanoue V., Hotulainen P. Dendritic spine actin cytoskeleton in autism spectrum disorder. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 84, part B, 2018, pages 362-381. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.08.023>.
- Johansson S.A.E., Johansson T.B. Analytical applications of particle induced X-ray emission. *Nuclear Instruments and Methods*, 137, Issue 3, 1976, pages 473-516. [https://doi.org/10.1016/0029-554X\(76\)90470-5](https://doi.org/10.1016/0029-554X(76)90470-5).
- Kaech S., Banker G. Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols*, 1, issue 5, 2006, pages 2406-2415. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.356>
- Keith S.L., Faroon O.M., Fowler B.A. Uranium. In *Handbook of the Toxicology of Metals* 4th edition. Editors: Nordberg G.F., Fowler B.A. Nordberg M. Elsevier, 2008, chapter 59, pages 881-904.
- Kiernan J.A., Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today*, 8, issue 1, 2000, pages 8-13. <https://doi.org/10.1017/S1551929500057060>.
- Kostka M., Högen T., Danzer K.M., Levin J., Habeck M., Wirth A., Wagner R., Glabe C.G., Finger S., Heinzlmann U., Garidel P., Duan W., Ross C.A., Kretschmar H., Giese A. Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers. *Journal of Biological Chemistry*, 283, issue 16, 2008, pages 10992-11003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709634200>.
- Lashuel H.A., Overk C.R., Oueslati A., Masliah E. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nature Reviews Neuroscience*, 14, issue 1, 2013, pages 38-48. <https://doi.org/10.1038/nrn3406>.
- Lasser M., Tiber J., Lowery L.A. The Role of the Microtubule Cytoskeleton in Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 2018, page 2018165. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00165>.
- Lee H.J., Shin S.Y., Choi C., Lee Y.H., Lee S.J. Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 277, issue 7, 2002, pages 5411-5417. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105326200>.
- Leyva-Illades D., Chen P., Zogzas C.E., Hutchens S., Mercado J.M., Swaim C.D., Morrisett R.A., Bowman A.B., Aschner M., Mukhopadhyay S. SLC30A10 is a cell surface-localized manganese efflux transporter, and parkinsonism-causing mutations block its intracellular trafficking and efflux activity. *The Journal of Neuroscience*, 34, issue 42, 2014, pages 14079-14095. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2329-14.2014>.

- Li W.J., Jiang H., Song N., Xie J.X. Dose- and time-dependent alpha-synuclein aggregation induced by ferric iron in SK-N-SH cells. *Neuroscience Bulletin*, 26, issue 3, 2010, pages 205-210.
<https://doi.org/10.1007/s12264-010-1117-7>.
- Li Y., He B., Hu L., Huang X., Yun Z., Liu R., Zhou Q., Jiang G. Characterization of mercury-binding proteins in human neuroblastoma SK-N-SH cells with immobilized metal affinity chromatography. *Talanta*, 178, 2018, pages 811-817. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.028>.
- Lichtman J.W., Conchello J.A. Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2, issue 12, 2005, pages 910-919.
<https://doi.org/10.1038/nmeth817>.
- Liddell J.R., White A.R. Nexus between mitochondrial function, iron, copper and glutathione in Parkinson's disease. *Neurochemistry International*, 117, 2018, pages 126-138.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.05.016>.
- Lukinavičius G., Reymond L., D'Este E., Masharina A., Göttfert F., Ta H., Güther A., Fournier M., Rizzo S., Waldmann H., Blaukopf C., Sommer C., Gerlich D.W., Arndt H.D., Hell S.W., Johnsson K. Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nature Methods*, 11, issue 7, 2014, pages 731-733. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2972>
- Lukinavičius G., Reymond L., Umezawa K., Sallin O., D'Este E., Göttfert F., Ta H., Hell S.W., Urano Y., Johnsson K. Fluorogenic Probes for Multicolor Imaging in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society*, 138, issue 30, 2016, pages 9365-9368. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b04782>
- MacDonald L., Baldini G., Storrie B. Does Super Resolution Fluorescence Microscopy Obsolete Previous Microscopic Approaches to Protein Co-localization?. *Methods in molecular biology*, 1270, 2015, pages 255–275. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2309-0_19
- Martínez-Criado G., Villanova J., Tucoulou R., Salomon D., Suuronen J.P., Labouré S., Guilloud C., Valls V., Barrett R., Gagliardini E., Dabin Y., Baker R., Bohic S., Cohen C., Morse J. ID16B: a hard X-ray nanoprobe beamline at the ESRF for nano-analysis. *Journal of Synchrotron Radiation*, 23, issue 1, 2016, pages 344-52.
<https://doi.org/10.1107/S1600577515019839>.
- Matsuyama, S., Shimura, M., Fujii, M., Maeshima, K., Yumoto, H., Mimura, H., Sano, Y., Yabashi, M., Nishino, Y., Tamasaku, K., Ishizaka, Y., Ishikawa, T. and Yamauchi, K. Elemental mapping of frozen-hydrated cells with cryo-scanning X-ray fluorescence microscopy. *X-Ray Spectrometry*, 39, 2010, pages 260-266.
<https://doi.org/10.1002/xrs.1256>.
- Mayer M. SIMNRA User's Guide. Max-Planck-Institut Für Plasmaphysik, Garching, Germany, 1997.
- Miah M.R., Ijomone O.M., Okoh C.O.A., Ijomone O.K., Akingbade G.T., Ke T., Krum B., da Cunha Martins A. Jr, Akinyemi A., Aranoff N., Antunes Soares F.A., Bowman A.B., Aschner M. The effects of manganese overexposure on brain health. *Neurochemistry International*, 135, 2020, page 104688.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104688>.
- Modabbernia A., Velthorst E., Reichenberg A. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Molecular Autism*, 8, number 13, 2017.
<https://doi.org/10.1186/s13229-017-0121-4>.

Morawski M., Meinecke C.H., Reiner, T., Dorffel A.C., Riedere, P., Arendt T., Butz T. Determination of trace elements in the human substantia nigra. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 231, 2005, pages 224-228. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2005.01.061>.

Morris C.M., Edwardson J.A. Iron histochemistry of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurodegeneration*, 3, issue 4, 1994, pages 277-282.

Mukhopadhyay S. Familial manganese-induced neurotoxicity due to mutations in SLC30A10 or SLC39A14. *Neurotoxicology*, 64, 2018, pages 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.07.030>.

Musumeci G. Past, present and future: overview on histology and histopathology. *Journal of Histology & Histopathology*, 1, issue 5, 2014. <http://dx.doi.org/10.7243/2055-091X-1-5>.

Nägerl U.V., Willig K.I., Hein B., Hell S.W., Bonhoeffer T. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, issue 48, 2008, pages 18982-18987. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810028105>

Nemet I., Ropelewski P., Imanishi Y. Applications of phototransformable fluorescent proteins for tracking the dynamics of cellular components, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14, issue 10, 2015, pages 1787-1806. <https://doi.org/10.1039/c5pp00174a>

Nong Q., Dong H., Liu Y., Liu L., He B., Huang Y., Jiang J., Luan T., Chen B., Hu L. Characterization of the mercury-binding proteins in tuna and salmon sashimi: Implications for health risk of mercury in food. *Chemosphere*, 263, 2021, pages 128110. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128110>.

Ortega R., Cloetens P., Devès G., Carmona A., Bohic S. Iron storage in neurovesicles revealed by chemical nano-imaging. *PLoS ONE*, 2, issue 9, 2007, page e925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000925>

Ortega R., Carmona A., Llorens I., Solari P.L. X-ray absorption spectroscopy of biological samples. A tutorial. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27, 2012, pages 2054-2065. <https://doi.org/10.1039/c2ja30224a>.

Ortega R., Bresson C., Darolles C., Gautier C., Roudeau S., Perrin L., Janin M., Floriani M., Aloin V., Carmona A., Malard V. Low-solubility particles and a Trojan-horse type mechanism of toxicity : the case of cobalt oxide on human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*. 11, 2014, 14. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-14>.

Ortega R., Carmona A., Roudeau S., Perrin L., Dučić T., Carboni E., Bohic S., Cloetens P., Lingor P. α -Synuclein Over-Expression Induces Increased Iron Accumulation and Redistribution in Iron-Exposed Neurons. *Molecular Neurobiology*, 53, issue 3, 2016, pages 1925-1934. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9146-x>.

Ostrerova-Golts N., Petrucelli L., Hardy J., Lee J.M., Farer M., Wolozin B. The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity. *Journal of Neuroscience*, 20, issue 16, 2000, pages 6048-6054. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-16-06048.2000>.

Parato J., Bartolini F. The Microtubule Cytoskeleton at the Synapse. *Neuroscience Letters*, 753, 2021, page 135850. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135850>

Parsons-White A.B., Spitzer N. Environmentally relevant manganese overexposure alters neural cell morphology and differentiation in vitro. *Toxicology In Vitro*, 50, 2018, pages 22-28.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.02.015>

Pelucchi S, Stringhi R, Marcello E. Dendritic Spines in Alzheimer's Disease: How the Actin Cytoskeleton Contributes to Synaptic Failure. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, issue 3, 2020, page 908.

<https://doi.org/10.3390/ijms21030908>.

Peng Y., Wang C., Xu H.H., Liu Y.N., Zhou F. Binding of alphasynuclein with Fe(III) and with Fe(II) and biological implications of the resultant complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104, issue 4, 2010, pages 365-370. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.11.005>.

Perrin L., Carmona A., Roudeau S., Ortega R. Evaluation of sample preparation methods for single cell quantitative elemental imaging using proton or synchrotron radiation focused beams. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30, issue 12, 2015, pages 2525-2532. <https://doi.org/10.1039/C5JA00303B>

Perrin L., Roudeau S., Carmona A., Domart F., Petersen J.D., Bohic S., Yang Y., Cloetens P., Ortega R. Zinc and Copper Effects on Stability of Tubulin and Actin Networks in Dendrites and Spines of Hippocampal Neurons. *ACS Chemical Neuroscience*, 8, issue 7, 2017, pages 1490-1499.

<https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00452>.

Popescu B.F., Frischer J.M., Webb S.M., Tham M., Adiele R.C., Robinson C.A., Fitz-Gibbon P.D., Weigand S.D., Metz I., Nehzati S., George G.N., Pickering I.J., Brück W., Hametner S., Lassmann H., Parisi J.E., Yong G., Lucchinetti C.F. Pathogenic implications of distinct patterns of iron and zinc in chronic MS lesions. *Acta Neuropathologica*, 134, issue 1, 2017, pages 45-64. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1696-8>.

Portier Ch.J., *Toxicological Profile for Manganese*, U.S. Department of Health and Human Services, ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2012.

Prat O., Berenguer F., Malard V., Tavan E., Sage N., Steinmetz G., Quemeneur E. Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity. *Proteomics*, 5, 2005, pages 297-306.

<https://doi.org/10.1002/pmic.200400896>

Quintana C. Cryofixation, cryosubstitution, cryoembedding for ultrastructural, immunocytochemical and microanalytical studies. *Micron*, 25, Issue 1, 1994, pages 63-99. [https://doi.org/10.1016/0968-4328\(94\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0968-4328(94)90056-6).

Quadri M., Federico A., Zhao T., Breedveld G.J., Battisti C., Delnooz C., Severijnen L.A., Di Toro Mammarella L., Mignarri A., Monti L., Sanna A., Lu P., Punzo F., Cossu G., Willemsen R., Rasi F., Oostra B.A., van de Warrenburg B.P., Bonifati V. Mutations in SLC30A10 cause parkinsonism and dystonia with hypermanganesemia, polycythemia, and chronic liver disease. *The American Journal of Human Genetics*, 90, issue 3, 2012, pages 467-477. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.01.017>.

Ralle M., Lutsenko S. Quantitative imaging of metals in tissues. *Biometals*, 22, issue 1, 2009, pages 197-205. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9200-5>.

Rendón W.O., Martínez-Alonso E., Tomás M., Martínez-Martínez N., Martínez-Menárguez .JA. Golgi fragmentation is Rab and SNARE dependent in cellular models of Parkinson's disease. *Histochemistry and Cell Biology*, 139, issue 5, 2013, pages 671-684. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1059-4>.

Robison G., Zakharova T., Fu S., Jiang W., Fulper R., Barrea R., Marcus M. A., Zheng W., Pushkar Y. X-ray fluorescence imaging: a new tool for studying manganese neurotoxicity. *PloS one*, 7, issue 11, 2012, page e48899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048899>

Roudeau S., Carmona A., Perrin L., Ortega R. Correlative organelle fluorescence microscopy and synchrotron X-ray chemical element imaging in single cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, issue 27, 2014, pages 6979-6991. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8004-4>

Salomé M., Cotte M., Baker R., Barrett R., Benseny-Cases N., Berruyer G., Bugnazet D., Castillo-Michel H., Cornu C., Fayard B., Gagliardini E., Hino R., Morse J., Papillon E., Pouyet E., Rivard C., Solé V. A., Susini J., Veronesi G. The ID21 Scanning X-ray Microscope at ESRF. *Journal of Physics: Conference Series*, 425, 2013, pages 182004. <http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/425/18/182004>

Saric M., Lucchini R. Manganese. In *Handbook on the Toxicology of Metals*. Editors: Nordberg G. F., Fowler B. A., Nordberg M., Friberg L. T., Academic Press, Elsevier, London, 3rd ed., 2007, chapter 32, pages 645-674. <https://doi.org/10.1016/B978-012369413-3/50087-2>

Sartori A., Gatz R., Beck F., Rigort A., Baumeister W., Plitzko J.M. Correlative microscopy: Bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography. *Journal of Structural Biology*, 160, issue 2, 2007, pages 135-145. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.07.011>

Schroer C. G., Baumbach C., Döhrmann R., Klare S., Hoppe R., Kahnt M., Patommel J., Reinhardt J., Ritter S., Samberg D., Scholz M., Schropp A., Seiboth F., Seyrich M., Wittwer F., Falkenberg G.. Hard x-ray nanoprobe of beamline P06 at PETRA III. *AIP Conference Proceedings*, 1741, 2016, page 030007. <https://doi.org/10.1063/1.4952830>.

Sian-Hülsmann J., Mandel S., Youdim M.B., Riederer P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 118, issue 6, 2011, pages 939-57. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07132.x>

Sindreu C., Bayés Á., Altafaj X., Pérez-Clausell J. Zinc transporter-1 concentrates at the postsynaptic density of hippocampal synapses. *Molecular Brain*, 7, 2014, pages 7-16. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-16>.

Smith S.D., She Y.M., Roberts E.A., Sarkar B. Using immobilized metal affinity chromatography, two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry to identify hepatocellular proteins with copper-binding ability. *Journal of Proteome Research*, 3, issue 4, 2004, pages 834-840. <https://doi.org/10.1021/pr049941r>

Somogyi A., Medjoubi K., Baranton G., Le Roux V., Ribbens M., Polack F., Philippot P., Samama J.P. Optical design and multi-length-scale scanning spectro-microscopy possibilities at the Nanoscopium beamline of Synchrotron Soleil. *J. Synchrotron Rad.* 22, issue 4, 2015, pages 1118-1129. <https://doi.org/10.1107/S1600577515009364>.

Sorieul S., Alfaut P., Daudin L., Serani L., Moretto Ph. Aifira: an ion beam facility for multidisciplinary research. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 332, 2014, pages 68-73. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2014.02.032>.

Stankiewicz J.M., Neema M., Ceccarelli A. Iron and multiple sclerosis. *Neurobiology of Aging*, 35, issue 2, 2014, pages S51-8. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.039>.

- Stephenson E., Nathoo N., Mahjoub Y., Dunn J.F., Yong V.W. Iron in multiple sclerosis: roles in neurodegeneration and repair. *Nature Reviews Neurology*, 10, issue 8, 2014, pages 459-68. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.118>.
- Stern M., Gierse A., Tan S., Bicker G. Human Ntera2 cells as a predictive in vitro test system for developmental neurotoxicity. *Archives of Toxicology*, 88, issue 1, 2014, pages 127-136. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1098-1>.
- Stoiber T., Degen .GH., Bolt H.M., Unger E. Interaction of mercury(II) with the microtubule cytoskeleton in IMR-32 neuroblastoma cells. *Toxicology Letters*, 151, issue 1, 2004, pages 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.11.017>
- Tam J., Merino D. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) in comparison with stimulated emission depletion (STED) and other imaging methods. *Journal of Neurochemistry*, 135, issue 4, 2015, pages 643-658. <https://doi.org/10.1111/jnc.13257>
- Tuschl K., Clayton P.T., Gospe S.M., Jr Gulab S., Ibrahim S., Singhi P., Aulakh R., Ribeiro R.T., Barsottini O.G., Zaki M.S., Del Rosario M.L., Dyack S., Price V., Rideout A., Gordon K., Wevers R.A., Chong W.K., Mills P.B. Syndrome of hepatic cirrhosis, dystonia, polycythemia, and hypermanganesemia caused by mutations in SLC30A10, a manganese transporter in man. *The American Journal of Human Genetics*, 90, issue 3, 2012, pages 457-466. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.01.018>.
- Vergnano A.M., Rebola N., Savtchenko L.P., Pinheiro P.S., Casado M., Kieffer B.L., Rusakov D.A., Mülle C., Paoletti P. Zinc Dynamics and Action at Excitatory Synapses. *Neuron*, 82, issue 5, 2014, pages 1101-1114. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.034>
- Vidaud C., Robert M., Paredes E., Ortega R., Avazeri E., Jing L., Guignonis J.M., Bresson C., Malard V. Deciphering the uranium target proteins in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Archives of Toxicology*, 93, issue 8, 2019, pages 2141-2154. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02497-4>
- Wakabayashi K., Tanji K., Odagiri S., Miki Y., Mori F., Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Molecular Neurobiology*, 47, issue 2, 2013, pages 495-508. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8280-y>.
- Wang J., Jiang H., Xie J.X. Time dependent effects of 6-OHDA lesions on iron level and neuronal loss in rat nigrostriatal system. *Neurochemical Research*, 29, 2004, pages 2239–2243. <https://doi.org/10.1007/s11064-004-7031-5>
- Wang T., Wang Q., Song R., Zhang Y., Yang J., Wang Y., Yuan Y., Bian J., Liu X., Gu J., Zhu J., Liu Z. Cadmium induced inhibition of autophagy is associated with microtubule disruption and mitochondrial dysfunction in primary rat cerebral cortical neurons. *Neurotoxicology and Teratology*, 53, 2016, pages 11-8. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.11.007>
- Ward R.J., Zucca F.A., Duyn J.H., Crichton R.R., Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *The Lancet Neurology*, 13, issue 10, 2014, pages 1045-60. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70117-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70117-6).
- Weiss B. Lead, manganese, and methylmercury as risk factors for neurobehavioral impairment in advanced age. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 11, 2011, 607543. <https://doi.org/10.4061/2011/607543>.

WHO, World Health Organization, 2010. WHO | Ten chemicals of major public health concern.

https://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/chemicals_phc/en/

Xiao T., Ackerman C.M., Carroll E.C., Jia S., Hoagland A., Chan J., Thai B., Liu C.S., Isacoff E.Y., Chang C.J. Copper regulates rest-activity cycles through the locus coeruleus-norepinephrine system. *Nature Chemical Biology*, 14, 2018, pages 655-663. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0062-z>

Zhao Y., Toselli P., Li W. Microtubules as a critical target for arsenic toxicity in lung cells in vitro and in vivo. *International Journal of Environmental Research Public Health*, 9, issue 2, 2012, pages 474-95. <https://doi.org/10.3390/ijerph9020474>.

Zhu M., Li W., Lu C. Role of alpha-synuclein protein levels in mitochondrial morphology and cell survival in cell lines. *PLoS One* 7, issue 4, 2012, page e36377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036377>.

Zimmermann H.P., Faulstich H., Hänsch G.M., Doenges K.H., Stournaras C. The interaction of triethyl lead with tubulin and microtubules. *Mutation Research*, 201, issue 2, 1988, pages 293-302. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(88\)90018-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(88)90018-8)

Zogzas C.E., Aschner M., Mukhopadhyay S. Structural elements in the transmembrane and cytoplasmic domains of the metal transporter SLC30A10 are required for its manganese efflux activity. *Journal of Biological Chemistry*, 291, issue 31, 2016, pages 15940-15957. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.726935>.

Zucca F.A., Segura-Aguilar J., Ferrari E., Muñoz P., Paris I. Sulzer D., Sarna T., Casella L., Zecca L. Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 155, 2017, pages 96-119. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.012>.

